

VŠB – Technická univerzita Ostrava
Fakulta elektrotechniky a informatiky
Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství

Identifikace poškození genů signální dráhy EGFR v buňce pro
upřesnění prognózy léčby u kolorektálního karcinomu

Identification of Genetic Damage EGFR Signaling Pathway in the
Cell for Prognosis of Treatment for Colorectal Cancer

VŠB - Technická univerzita Ostrava
Fakulta elektrotechniky a informatiky
Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Květoslava Faltýnková**

Studijní program: N2649 Elektrotechnika

Studijní obor: 3901T009 Biomedicínské inženýrství

Téma: Identifikace poškození genů signální dráhy EGFR v buňce pro upřesnění
prognózy léčby u kolorektálního karcinomu
Identification of Genetic Damage EGFR Signaling Pathway in the Cell
for Prognosis of Treatment for Colorectal Cancer

Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

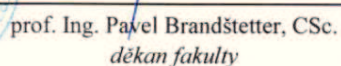
Zadáním diplomové práce je návrh a realizace modelu signálové dráhy EGFR v buňce s využitím prvků umělé inteligence, pro upřesnění prognózy léčby u kolorektálního karcinomu (CRC). Práce popíše biologickou podstatu vzniku nádoru, vysvětlí terminologii molekulární biologie a sumarizuje biologické modely vzniku CRC s vybranými parametry signálních drah. V práci bude vytvořen model signální dráhy EGFR v buňce, který bude odzkoušen na skutečných klinických datech pro ověření jeho funkčnosti, v závislosti na základě klasifikace vzniku nádoru podle TNM modelu, který charakterizuje klinický stav pacienta.

Body zadání:

1. Teoretický rozbor problematiky biologické podstaty vzniku nádoru.
2. Analýza biologických modelů vzniku CRC s vybranými parametry signálních drah.
3. Návrh modelu buňky se signálovou dráhou EGFR v Matlabu (K-RAS, RAF, B-RAF, MEK, ERK).
4. Implementace vlivu reparačního systému P53 na stav dráhy EGFR v buňce pomocí neuronové sítě backpropagation.
5. Identifikace poškození reparačního systému buňky na základě výskytu MSI (mikrosatelitová instabilita), v důsledku poškození klíčových reparačních genů, jako např. MSH, MLH, atd.)
6. Implementace DDR bariery pro určení poškození genů v horizontu 30 let s využitím fuzzy expertního systému.
7. Otestování chování modelu buňky pro signálovou dráhu EGFR na skutečných klinických datech podle klasifikace modelu TNM a ověření jeho funkčnosti.
8. Zhodnocení dosažených výsledků.

Seznam doporučené odborné literatury:

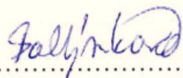
- [1] POKORNÝ, Miroslav a Vilém SROVNAL. *Znalostní systémy řízení – Učební text a návody do cvičení*. Ostrava: VŠB-Technická univerzita Ostrava, 2012.
- [2] JURA, Pavel. *Základy fuzzy logiky pro řízení a modelování*. Vyd. 1. Brno: VUTUM, 2003. ISBN 80-214-2261-0.
- [3] VESELÝ, Arnošt. *Úvod do umělé inteligence*. Praha: ČZU Praha, 2005. ISBN 80-213-1361-7.
- [4] TSOUKALAS Lefteri H., Robert E. UHRIG a Lotfi A ZADEH. *Fuzzy and Neural Approaches in Engineering MATLAB Supplement*. New York: Wiley-Interscience, 1997. ISBN 978-0-471-16003-8.



PROHLÁŠENÍ STUDENTA

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.“

V Ostravě dne 29.06.2018


.....
podpis

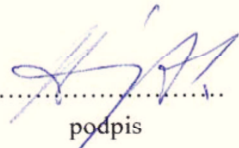
PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu své diplomové práce, Ing. Vilému Srovnalovi, Ph.D., a vedoucímu Oddělení lékařské genetiky Laboratořích Agel a.s v Novém Jičíně, Ing. Arpádu Bódayovi, za cenné rady při zpracovávání práce, odbornou pomoc a poskytnutou literaturu.

PROHLÁŠENÍ ZÁSTUPCE SPOLUPRACUJÍCÍ PRÁVNICKÉ NEBO FYZICKÉ OSOBY

„Souhlasím se zveřejněním této diplomové práce dle požadavků čl. 26, odst. 9 Studijního a zkušebního řádu pro studium v magisterských programech VŠB-TU Ostrava.“

V Novém Jičíně dne 27.06.2018

.....

podpis

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou biologické podstaty vzniku nádoru. Soustředí se především na signální dráhu EGFR, která souvisí se vznikem kolorektálního karcinomu. Cílem práce je navrhnout a realizovat model buňky se signálovou dráhou EGFR v programu MATLAB a testovat tento model na skutečných datech. K modelování buňky se signální dráhou EGFR je použit Schoeberlův model, který je doplněn pravděpodobnostní maticí. Tato pravděpodobnostní matice představuje pravděpodobnosti vzniku spontánních a indukovaných mutací v sledovaných genech. Do modelu buňky je zakomponována dráha p53, která je brána jako hlavní strážce genomu a MSI systém, který identifikuje stabilitu genomu na základě poškození MMR genů. K určení poškození genů v horizontu 30 let slouží funkce DDR bariéry. Funkčnost celého modelu je ověřena na základě TNM systému, který charakterizuje klinický stav pacienta.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nádorové onemocnění, kolorektální karcinom, biologické modely vzniku CRC, TNM klasifikace, biologická léčba, signální dráha EGFR, MATLAB, Schoeberlův model, p53, MSI, MMR geny, DDR bariéra, fuzzy.

ABSTRACT

The diploma thesis deals with the biological essence of tumor formation. It focuses primarily on the EGFR signaling pathway, which is related to the development of colorectal carcinoma. The aim of the thesis is to design and implement the model of the cell with the EGFR signal path in MATLAB and to test this model on real data. A Schoeberl model is used to model the cell with the EGFR signaling pathway, supplemented by a probability matrix. This probability matrix represents the probability of occurrence of spontaneous and induced mutations in the monitored genes. A p53 pathway is incorporated into the cell model, which is considered to be the main genome guard and an MSI system that identifies the stability of genome based on MMR genes damage. The DDR barrier aims to determine the damage of the genes at the 30-year horizon. The functionality of the entire model will be verified on the basis of the TNM system, which characterizes the clinical condition of the patient.

KEYWORDS

Cancer, colorectal carcinoma, biological models of CRC, TNM classification, biological treatment, the EGFR signaling pathway, MATLAB, Schoeberl model, p53, MSI, MMR genes, DDR barrier, fuzzy

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk	7
Seznam ilustrací	8
Seznam tabulek	8
Úvod	9
1 Nádorové onemocnění	10
1.1 Karcinogeneze	10
1.1.1 Proto-onkogeny a onkogeny	12
1.1.2 Tumor-supresorové geny	14
1.1.3 MMR geny	15
2 Kolorektální karcinom	16
2.1 Familiární adenomatózní polypóza	16
2.2 Lynchův syndrom	17
2.3 Biologické modely vzniku CRC	18
2.3.1 Model adenom-karcinom	19
2.3.2 Model chromozomální instability (CIN)	20
2.3.3 Model mikrosatelitové instability (MSI)	20
2.3.3.1 MSI-L	21
2.3.3.2 MSI-H	22
2.4 TNM klasifikace CRC	23
2.5 Biologická léčba	25
2.5.1 Cetuximab	25
2.5.2 Panitumumab	25
2.5.3 Bevacizumab	25
3 Praktická část	26
3.1 Model buňky	26
3.1.1 Signální dráha EGFR	26
3.1.2 Model Simulink	27
3.1.3 Schoeberlův model	30
3.1.4 Pravděpodobnostní matice	36
3.2 Systém p53	38
3.3 Systém MSI	40
3.4 DDR bariéra	40
3.5 Testování modelu	42
3.5.1 Poškození genů	42
3.5.2 Rozřazení pacientů dle TNM	44
3.5.2.1 Fuzzy systém	45
3.5.2.2 Vstupy a výstupy systému a jejich funkce příslušnosti	46
3.5.2.3 Báze pravidel	50
3.5.2.4 Vyhodnocení rozřazení	52
Závěr	54
Literatura	55

Seznam použitých symbolů a zkratek

TAA – Tumor Associated Antigen (antigen pro nádorové buňky)
MMR – Mismatch Repair (reparační systém kódovaný s několika geny)
CRC – Colorectal Carcinoma (kolorektální karcinom)
FAP – Familial Adenomatous Polyposis (familiární adenomatózní polypóza)
HNPCC – Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (hereditární nepolypózní kolorektální karcinom)
CIN – Chromosome Instability (chromozomální instabilita)
LOH – Loss of Heterozygosity (ztráta heterozygosity)
MSI – Microsatellite Instability (mikrosatelitní instabilita)
MSI-L – Microsatellite Instability Low (nízká mikrosatelitní instabilita)
MSI-H – Microsatellite Instability High (vysoká mikrosatelitní instabilita)
TNM – Tumour-Nodes-Metastasis (nomenklatura popisující charakter nádoru, uzlin a metastáz)
UV – Ultraviolet (ultrafialové záření)
DDR – DNA damage response (odpověď na poškození DNA)

Seznam ilustrací

Obrázek 1 Inicie a promoce [2]	11
Obrázek 2 Karcinogeneze [2]	12
Obrázek 3 Proto-onkogeny a onkogeny [7]	13
Obrázek 4 Tumor-supresorové geny [7]	14
Obrázek 5 "Mismatch repair" proces [11]	15
Obrázek 6 Modely vzniku CRC	18
Obrázek 7 Model adenom-karcinom	19
Obrázek 8 Vrstvy střeva [47]	23
Obrázek 9 Signálová dráha EGFR	26
Obrázek 10 Model buňky Simulink	27
Obrázek 11 Blokový diagram modelu buňky	28
Obrázek 12 Blokový diagram modelu buňky	29
Obrázek 13 Schoeberlův model [49]	31
Obrázek 14 Část A1 - EGFR, cesta závislá na Shc [49]	32
Obrázek 15 Část A2 - EGFR, cesta nezávislá na Shc [49]	32
Obrázek 16 Část B1 - RAS, cesta závislá na Shc	33
Obrázek 17 Část B2 - RAS, cesta nezávislá na Shc [49]	33
Obrázek 18 Část C – RAF [49]	33
Obrázek 19 Část D – MEK [49]	34
Obrázek 20 Část E – ERK [49]	34
Obrázek 21 Průběhy signálů v dráze EGFR	35
Obrázek 22 DDR bariéra	41
Obrázek 23 Fuzzy systém [52]	44
Obrázek 24 Tvary funkcí příslušnosti [52]	44
Obrázek 25 Průnik a sjednocení [52]	45
Obrázek 26 Fuzzy systém	46
Obrázek 27 Funkce příslušnosti vstupů	48
Obrázek 28 Funkce příslušnosti výstupů	49
Obrázek 29 Nastavení pravidel	50
Obrázek 30 Implikace, agregace a defuzzifikace	52

Seznam tabulek

Tabulka 1 Rozdělení do stádií	24
Tabulka 2 Sledované geny	37
Tabulka 3 Výsledky poškození sledovaných genů	43
Tabulka 4 Rozřazení pacientů	53

Úvod

Předložená práce se zabývá problematikou poškození buněčného cyklu, které způsobuje vznik nádoru. Jedná se o složitý proces signálních drah, jejich aktivaci, zpětných vazeb a dodnes ne zcela jednoznačně známých dalších dějů a jejich kooperaci. Z tohoto důvodu byla vybrána EGFR dráha ovlivňující vznik kolorektálního karcinomu.

Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější nádorové onemocnění. Z genetického hlediska je dělíme na sporadické, familiární a hereditární formy. Během několika let kumulující genetické a epigenetické změny způsobují postupnou transformaci epitelu tlustého střeva a konečníku skrz hypertrofii až k metastazujícímu nádoru.

Důležitou a molekulárně biologicky dobře prostudovanou cestou je signální dráha EGFR. Součástí této dráhy je několik desítek molekul, které zajišťují paralelní přenos aktivačního signálu z povrchu buňky do buněčného jádra, stimulující růst a dělení buněk. Narušením rovnováhy zpětných vazeb tohoto procesu, aktivací onkogenů, inhibicí tumorsupresorů a poškození reparačních systémů, apoptózy a dalších změn, dojde k nekontrolovanému buněčnému dělení.

V této práci je navržen a realizován model buňky se signální dráhou EGFR v programu MATLAB a testován na skutečných datech. Používaný Schoeberlův model je doplněn maticí, která definuje pravděpodobnosti vzniku spontánních a indukovaných mutací ve sledovaných genech. Model buňky dále počítá s dráhou p53, hlavním strážcem genomu, a systémem MSI, odrážející stabilitu genomu na základě poškození MMR genů. Použitím funkce DDR bariéry v horizontu 30 let je získána křivka demonstrující míru poškození buňky.

1 Nádorové onemocnění

Nádor neboli novotvar, je obecně označován za nově vytvořený tkáňový útvar či buněčnou populaci v organismu, jejichž reakce na vnější nebo vnitřní podněty nevzniká fyziologicky, jeví známky abnormality a více či méně uniká z regulačního vlivu okolních buněk a celého organismu.

Tato samoregulační schopnost všech nádorů se projevuje především při regulaci buněčného dělení (proliferaci) a buněčné smrti. Díky těmto procesům je zajištěna tkáňová homeostáza, která bývá narušena i za fyziologických podmínek (procesy hojení – reparace, náhrady ztracení tkání - regenerace nebo při zánětech). Zdravý organismus je však vybaven mechanismy, které dokáží tento nerovnovážený stav omezit a nadbytečnou proliferaci zastavit, jedná se o tzv. regulaci pomocí negativní zpětné vazby. Proto při poruchách těchto autoregulačních mechanismů, které jsou nejčastěji způsobeny genetickými chybami, může dojít ke vzniku nádoru [1].

Zdravá buňka má určitý tvar a strukturu. Reaguje na podněty ze svého okolí a ke vzniku dceřiných buněk dochází pouze tehdy, kdy rovnováha stimulačních a inhibičních signálů, které přichází z okolí, povolí buněčné dělení [2].

Nádorová buňka se od zdravé buňky liší především:

- Schopností neomezeného růstu – tvorba vlastních růstových faktorů
- Schopností růstu bez působení růstových faktorů
- Neomezeným dělením
- Vysokou chromozomální nestabilitou - změněný počet chromosomů či chromosomální přestavby
- Potlačením tvorby normálních antigenů a vytvořením specifických membránových antigenů pro nádorové buňky (např. TAA – Tumor associated antigen) [1, 2]

Nádory lze dělit podle míry nebezpečí na benigní a maligní [2].

Benigní neboli nezhoubný nádor je nádor, který je dosti podobný zdravé tkáni. Má ostré hranice od okolní tkáně, tedy neprorůstá do okolních struktur, nezakládá sekundární ložiska (metastázy), avšak projevuje se nekontrolovatelným růstem.

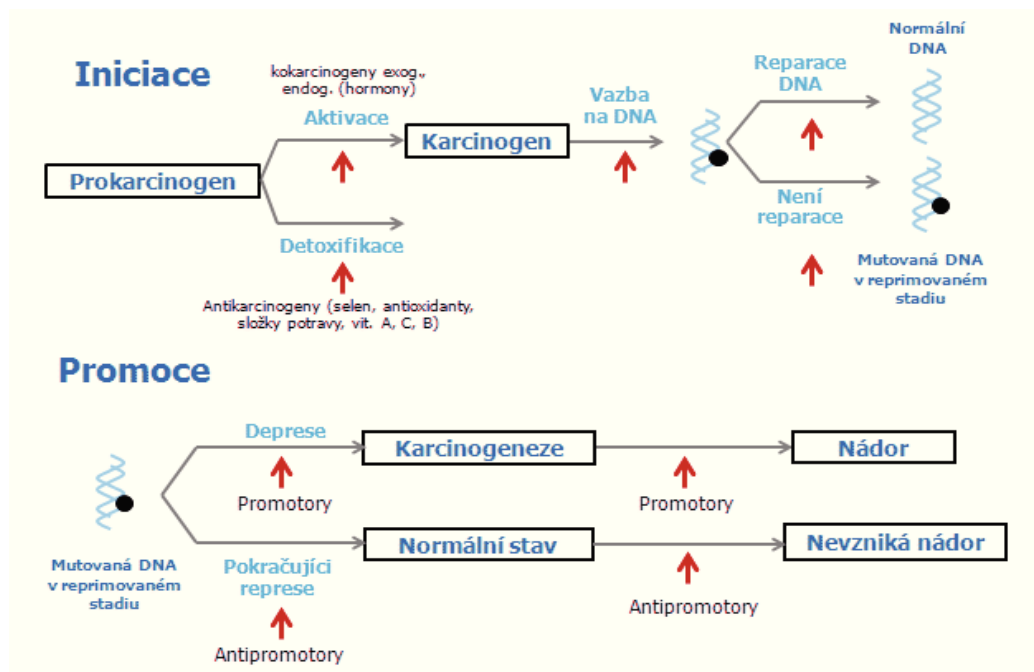
Maligní nádor, neboli zhoubný, se projevuje také nekontrolovaným růstem. Na rozdíl od benigního dochází k prorůstání do okolních tkání a k migraci nádorových buněk do vzdálených míst pomocí krevního a lymfatického oběhu, kde poté vznikají sekundární nádory – metastázy [1, 2].

1.1 Karcinogeneze

Karcinogeneze neboli vznik a vývoj nádorového onemocnění je velice složitý a mnohastupňový proces. Tento proces je výsledkem kombinace genetických a epigenetických změn. Mezi genetické změny patří mutace a mezi epigenetické změny patří změny, které ovlivňují expresi genů (změny metylace DNA a acetylace histonů), přenos signálů regulující buněčný cyklus a další. Proto k tomu, aby buňka prošla procesem maligní transformace, je nutná účast mnoha faktorů [2].

Proces karcinogeneze se skládá ze tří fází – iniciační, promoční a progresní.

Iniciační a promoční fáze obsahují změny struktury v DNA, progresní fáze zahrnuje především změny v proliferaci iniciovaných buněk a jejich potomků a změny v genové expresi (Obrázek 1) [2].

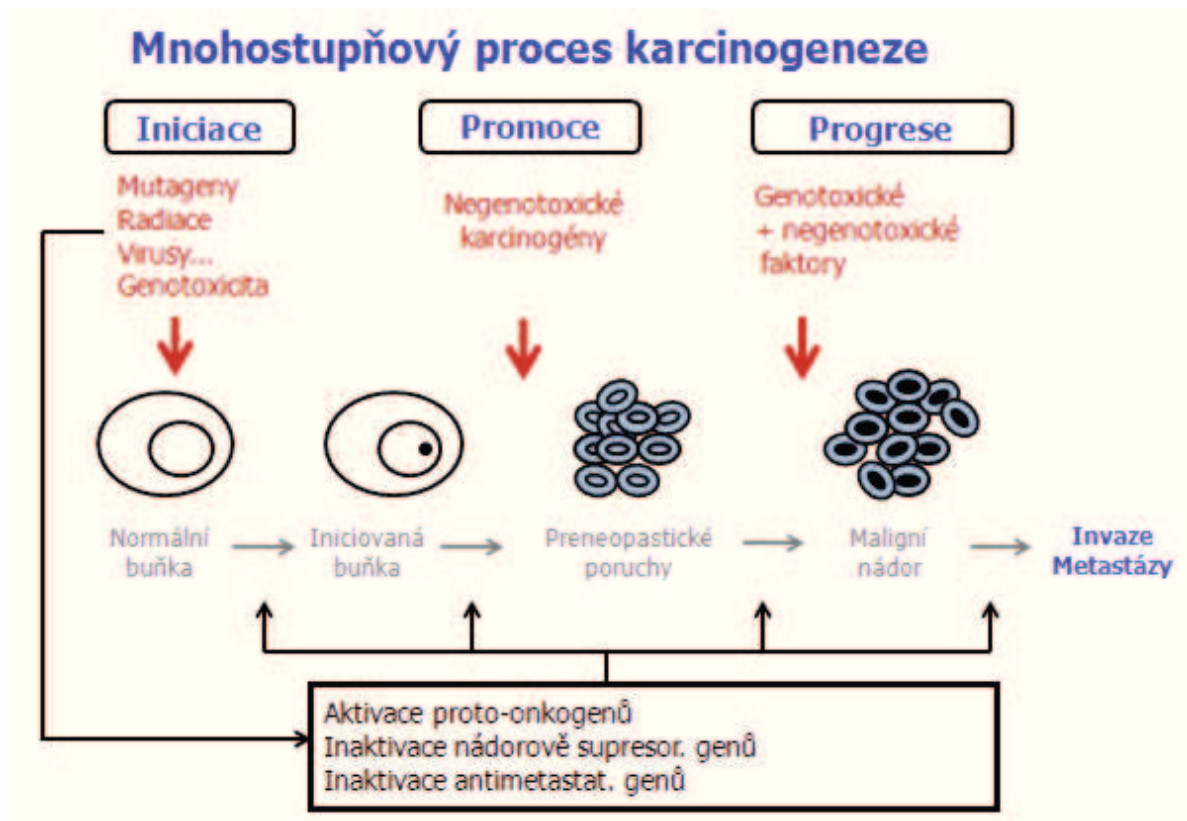


Obrázek 1 Iniciace a promoce [2]

Ve stádiu iniciace dochází k první genetické události, která je časově krátká a nevratná. Zdravá buňka se mění v buňku iniciovanou. Tuto změnu vyvolávají genetické změny v kritických genech (např. v proto-onkogenech). U sporadických forem nádorů iniciaci způsobují mutagenní kancerogeny a u nádorů hereditárních iniciaci způsobuje ztráta heterozygoty v odpovídající cílové buňce [2, 3].

Ve stádiu promoce iniciované buňky působením promočních faktorů rostou a rozvíjí se. Vznikají tak shluky přednádorových buněk. Mezi promoční faktory patří například skupina nemutagenních látek v kouři z cigaret, které povzbuzují iniciované buňky nádoru plic nebo zvýšená hladina žlučových kyselin zapříčiněná dietou, která je bohatá na tuky, u nádoru tlustého střeva a rekta. Tato fáze je dlouho trvající (léta, desetiletí) a nejdříve vratná, později se však stává nevratnou.

Ve stádiu progresu dochází k vývoji samotného nádoru nahromaděním mutací v ostatních genech v klonu. Dochází k velkým změnám v genomu, které způsobují zvýšení rychlosti proliferace a vznik metastáz. Mezi tyto změny patří hlavně změny v počtu chromozomů, přestavby chromosomů (translokace) a delece, inserce a amplifikace genů. Tato fáze způsobuje nevratný přechod přednádorové populace v nádorovou a přechod z benigního nádoru k malignímu (Obrázek 2) [2, 3].



Obrázek 2 Karcinogeneze [2]

Než dojde k malignímu růstu je zapotřebí, aby se akumuloval dostatek mutací, což většinou trvá desítky let. U některých jedinců je tato doba dosti zkrácena. Příčinou zkrácení doby je dědičnost některých mutovaných genů, které způsobují rakovinu. Jakmile rodičovská zárodečná buňka obsahuje mutaci v určitém genu, tak u potomka je tato mutace obsažena ve všech buňkách a tím se zvyšuje pravděpodobnost vzniku nádoru [2].

Během karcinogenního procesu dochází k aktivaci onkogenů a zároveň k inaktivaci tumor-supresorových a reparačních genů (MMR) [4, 5].

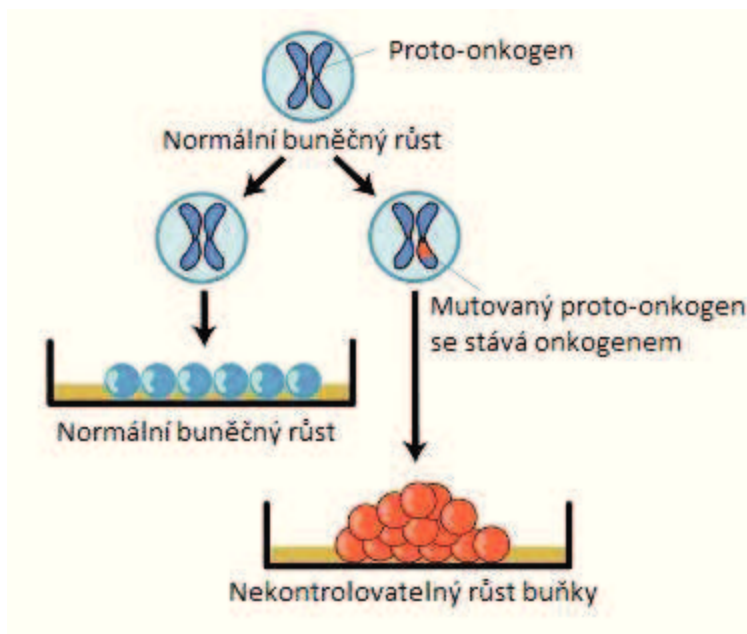
1.1.1 Proto-onkogeny a onkogeny

V buněčném genomu existují geny, které mají přímý vliv na vznik nádorového onemocnění, pokud dojde k jejich poškození. Tyto geny mají za fyziologických podmínek určitou strukturní funkci. Kódují především růstové faktory, jejich receptory a jiné látky ovlivňující růst, faktory, které se účastní přenosu signálu v buňce (transdukční mechanismy) a faktory, které se účastní regulace genové exprese (transkripční faktory). V této fázi se nazývají proto-onkogeny, které plní svou běžnou funkci a nedisponují žádnými negativními vlivy na buňku. Je třeba si uvědomit, že i běžný vliv proto-onkogenů je převážně takový, že podporuje dělení buňky [6].

Základní osa regulace buněčného růstu a dělení:

Syntéza růstového faktoru → růstový faktor → odpovídající receptor → přenos biosignálu z receptoru → výkonné mechanismy vzájemně působící s jadernou DNA → finální ovlivnění buněčného cyklu.

Jak jde vidět, proces regulace buněčného růstu a dělení je možno narušit v jakékoli fázi. Jakmile proto-onkogeny jsou zasaženy mutací, jsou už ale nazývány onkogeny. Onkogeny jsou tedy tytéž strukturní geny jako proto-onkogeny, ale již mutované. Název nám už napovídá, že je jejich vliv na buňku čistě negativní čili "rakovinnotvorný". I když se každý gen v genomu buňky vyskytuje ve dvou alelách, u proto-onkogenů stačí zasáhnout mutací pouze jednu alelu genu, aby došlo k odstartování vzniku nádorového onemocnění (Obrázek 3) [6, 7].

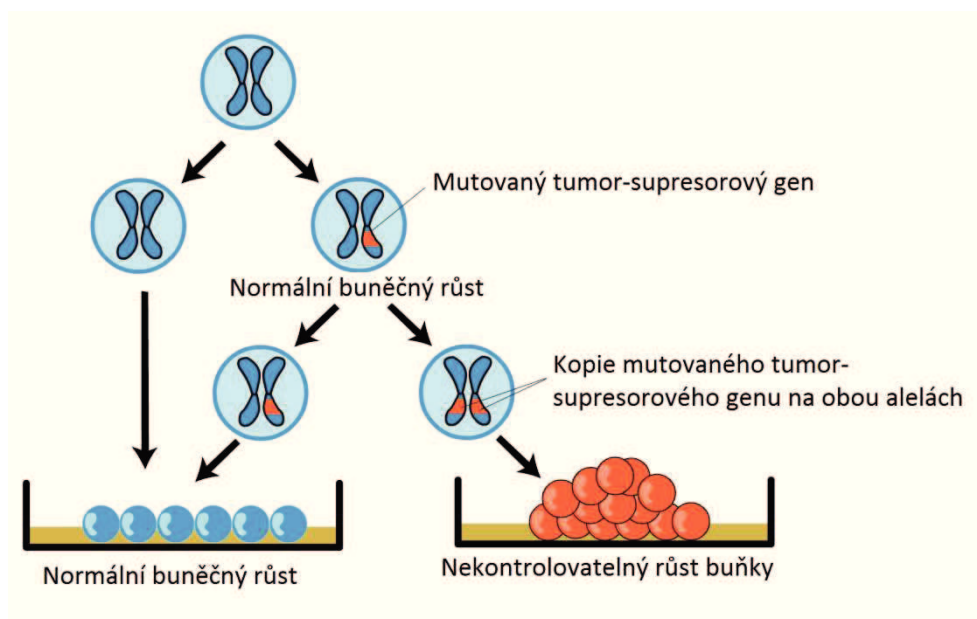


Obrázek 3 Proto-onkogeny a onkogeny [7]

Mezi nejčastější mutace u proto-onkogenů patří bodové mutace a chromozomové přestavby. Bodové mutace narušují původní sekvenci nukleotidu a způsobují zařazení jiné aminokyseliny či vznik STOP kodonu, kdy dochází k ukončení translace. U chromozomových přestaveb dochází k narušení sekvence genu nebo přemístění genu k vysoce aktivní promotorové oblasti, gen tedy bude prepisován o hodně častěji než za fyziologických podmínek [6].

1.1.2 Tumor-supresorové geny

Tumor-supresorové geny, neboli nádorově supresorové geny či nádorové supresory, potlačují vznik nádorového onemocnění. Mezi hlavní funkce těchto genů patří řízení buněčného cyklu, a fungují jako "pojistky", které vypnou buněčný cyklus v případě nekontrolovaného dělení či poškození genetické informace. Pokud dojde k inaktivaci tumor-supresorových genů, zvyšuje se pravděpodobnost, že buňky uniknou z vlivu kontrolních mechanismů a začnou nekontrolovaně růst a dojde tak k invazivitě a vývoji nádoru. Většina genů, které kódují nádorově supresory, jsou recesivní. K úplné ztrátě jejich funkce dochází jen v případě, že budou poškozeny obě alely těchto genů. Inaktivace pouze jedné alely je nedostačující a proto je potřeba dvě mutace, které vyřadí obě alely z funkce (Obrázek 4) [6, 7].



Obrázek 4 Tumor-supresorové geny [7]

Tumor-supresorové geny hrají velmi podstatnou roli při dědičnosti nádorových onemocnění. Již víme, že v každé zdravé buňce je potřeba postupně inaktivovat mutací obě alely konkrétního nádorově supresorového genu, aby mohlo dojít k rozvoji nádorového onemocnění. Jestliže však jeden z rodičů vlastní již mutovanou alelu nádorově supresorového genu a předá ji svému potomkovi, potom stačí, aby mutace postihla pouze jednu alelu genu – tu druhou (zdravou) a automaticky se zvyšuje pravděpodobnost vzniku nádorového onemocnění. Tato situace se nazývá tzv. Knudsonova teorie dvojího zásahu. Za první zásah je považováno „zdědění“ jedné mutované alely od některého z rodičů a za druhý zásah je považována mutace druhé alely genu, kterou jedinec získá v průběhu života.

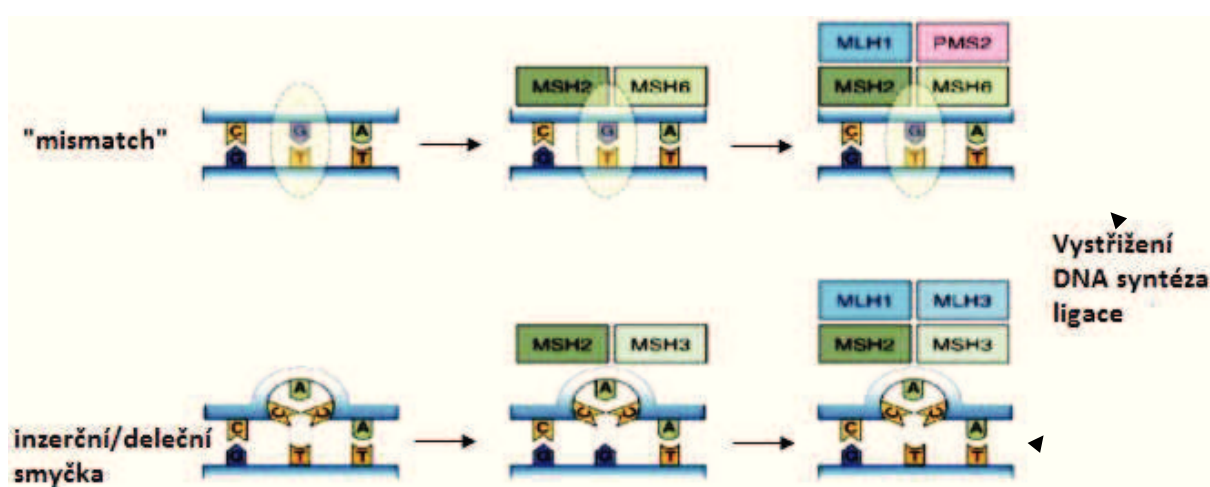
Lidé s těmito genetickými predispozicemi mají znatelně zvýšenou šanci, že u nich dojde k rozvoji určitého nádorového onemocnění.

Mezi nejznámější tumor-supresorové geny patří TP53 a RB1 [6, 7]

1.1.3 MMR geny

MMR geny neboli "mismatch repair" geny kódují MMR proteiny, které jsou důležitými strážci genomu. MMR proteiny totiž znemožňují hromadění samovolných mutací vznikajících během procesu replikace DNA [1]. "Mismatch repair" geny se především uplatňují při opravě chybně spárovaných nukleových bází během procesu DNA replikace a při opravě poškození DNA způsobené mutageny [8].

Na Obrázku 5 je možné vidět "mismatch repair" systém. V prvním kroku jsou rozpoznány špatně přiřazené báze ("mismatch repair") pomocí proteinů MSH2 a MSH6, inserce/delece pomocí proteinů MSH2 a MSH3 a jsou signalizovány poškozené sekvence. V místech poškození dochází k aktivaci proteinů MLH1 a PMS2 pro místa "mismatch repair" a proteinů MLH1 a MLH3 pro inserce/delece. V posledním kroku dochází k vystřížení chyb, syntéze DNA a ligaci [9, 10, 11].



Obrázek 5 "Mismatch repair" proces [11]

Poškození tohoto DNA opravného systému vede k „mutovanému fenotypu“, ve kterém dochází k akumulaci genetických mutací v genomu, a to zejména v opakujících se sekvencích DNA nazývané mikrosatelity. Mezi příklady mikrosatelitních sekvencí patří mono- (AAAA), di- (CACACACA) a tri- (CAGCAGCAGCAG) nukleotidy, které se opakují. Chyby replikace v těchto opakujících se sekvencích jsou běžné a jejich neefektivní opravy vedou k hromadění mutací, což se označuje jako mikrosatelitní nestabilita (MSI). Některé mikrosatelitní sekvence jsou v nekódujících oblastech genomu, zatímco jiné jsou v genech. Předpokládá se, že hromadění mutací v mikrosatelitních sekvencích nádorově supresorových genů, je může deaktivovat a urychlit tak proces maligní transformace [11].

Prvotní poznámka o úloze "mismatch repair" genů, co se týče teorie karcinogeneze, byla uvedena v souvislosti se sporadickým nádorem tlustého střeva a rekta [12].

Mezi "mismatch repair" geny patří geny MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2 a další.

2 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější nádorové onemocnění zejména ve vyspělých zemích světa. Většina případů jsou sporadických, jejichž genetické změny jsou omezeny jenom na tlusté střevo a konečník. U familiárních forem riziko vzniku onemocnění u příbuzných je dáno genetickým pozadím organismu, většinou přenosem genů s malým účinkem a jejich kombinací u daného jedince. Hereditární formy jsou způsobeny segregací konkrétního malého počtu genů s velkým účinkem na karcinogenezi. Karcinom vzniká v buňkách epitelu tlustého střeva nebo konečníku a proto je označen jako kolorektální karcinom (CRC). [13].

Mezi charakteristické klinické příznaky CRC patří krvácení z konečníku, chudokrevnost, snížení hmotnosti, ztráta chuti k jídlu, nevolnost a další. Vliv na pravděpodobnost vzniku nádorového onemocnění tlustého střeva a rekta má vyšší věk, mužské pohlaví a životní styl (stravování, kouření, nadměrná konzumace alkoholu, nižší fyzická aktivita). Zajímavostí je, že vysoký příjem vápníku a česneku pravděpodobnost vzniku CRC snižuje [14, 15].

Rakovina tlustého střeva a rekta se řadí k nejčastěji karcinomům v České republice. Většina kolorektálních karcinomů (75-80 %) jsou sporadického charakteru. Tyto nádory jsou způsobené hlavně vnějšími vlivy. Zbytek kolorektálních karcinomů (20-25 %) mají familiární a hereditární charakter, jsou tedy vrozené. Výskyt familiární formy nádorového onemocnění střeva a rekta se uvádí 15-20 %. Důležitým faktorem této vrozené formy je pozitivní nádorová rodinná anamnéza, lokalita a životní styl celé rodiny (pohybové a stravovací návyky). Výskyt hereditární formy nádorového onemocnění střeva a rekta se uvádí pouze asi 5%. Tato forma je zapříčiněna vrozenou predispozicí, způsobené přenosem poškozeného genu. K významným typům vrozených forem nádoru tlustého střeva a rekta řadíme familiární adenomatózní polypóza (FAP) a Lynchův syndrom, dříve označovaný jako hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) [16, 17].

2.1 Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je autozomálně dominantní onemocnění, které se vyznačuje stovkami až tisíci polypů v tlustém střevě a konečníku, nebo menším počtem polypů avšak v mladším věku, především u rodin s prokázanou FAP. Polypy se začínají tvořit okolo 15. roku věku, přičemž ve věku 35 let má polypy 95 % osob. U většiny pacientů dochází bez chirurgické léčby k vývoji kolorektálního karcinomu. Frekvence výskytu FAP je 1/5000–7500 a tvoří 0,5-1 % všech nádorů CRC [18, 19].

Příčinou onemocnění jsou zárodečné mutace v genu APC (Adenomatous Polyposis Coli). APC gen patří mezi tumor-supresorové geny, které regulují buněčný cyklus, zabraňují nekontrolovanému dělení buněk a potlačují vznik a rozvoj nádoru. Tento gen se nachází na dlouhém raménku 5. chromosomu (5q21) a bylo již zjištěno 690 zárodečných mutací, které způsobují vznik nefunkčního proteinu. Typ a lokalizace mutace v genu APC mají vliv na klinické projevy onemocnění FAP, proto se Familiární adenomatózní polypóza vyskytuje ve více formách [18, 19].

Těžká polypóza se projevuje přítomností více než 5 000 kolorektálních polypů a je většinou zjištěna u pacientů, kteří vlastní zárodečnou mutaci v APC genu lokalizovanou mezi kodony 486-499, 1249-1464 a v kodonu 233. Kodon je označení pro trojici nukleotidů, jejichž vzájemná kombinace

určuje druh aminokyseliny. Nejtěžší forma Familiární adenomatózní polypózy obsahuje mutaci v místě kodonu 1249-1330 a dochází tak k rozvoji onemocnění ve velmi mladém věku (okolo 20 let věku) a jedná se o nejčastější mutaci, která s delecí pěti bází v kodonu 1061 tvoří asi 15-20 % mutací u pacientů s FAP [18, 19].

Atenuovaná forma FAP se vyznačuje výrazně menším počtem adenomatózních polypů (méně než 100) a bývá zjištěna především u pacientů se zárodečnou mutací v genu APC, která se vyskytuje na externím 5' konci (mezi kodony 1-163) nebo na 3' konci (mezi kodony 1860-1987). Mutace se také může nalézat v exonu 9, v oblasti podléhající alternativnímu sestřihu [19].

Manifestace FAP mimo kolorektum zahrnují desmoidní nádory, polypy v horním gastrointestinálním traktu a osteomy a jsou pozorovány u pacientů s mutací APC genu v místě mezi kodony 1395-1578 [19].

MYH asociovaná polypóza patří mezi autozomálně recesivní onemocnění, které je podmíněno bialelickou zárodečnou mutací v genu MYH. Gen MYH se nachází na p raménku (krátké raménko), chromozomu 1. Jeho nejdůležitější funkcí je odstranění chyb v DNA způsobených oxidací. Nalezené varianty v genu MYH mělo 7 % pacientů, kterým byla diagnostikována klasická adenomatózní polypóza. U těchto pacientů nebyla však nalezena zárodečná mutace v genu APC [18, 20].

Jak již bylo zmíněno, Familiární adenomatózní polypóza patří mezi dědičné onemocnění, proto by měli být vyšetřeni všichni příbuzní prvního stupně (rodiče, sourozenci, děti od 10 do 15 let) a mělo by jim být nabídnuto genetické poradenství u klinického genetika [19].

2.2 Lynchův syndrom

Lynchův syndrom patří mezi autozomálně dominantní onemocnění. Tento syndrom se vyznačuje germinální mutací v MMR genech. MMR geny patří mezi tumor supresorové geny vytvářející enzymy, které opravují chyby v DNA vzniklé při tvorbě kopií (replikaci) [21, 22].

První zmínku o Lynchově syndromu zapsal profesor Warthin v roce 1913. Lynchův syndrom popsal jako případ „karcinomové rodiny G“. Když se nadále tímto případem zabýval, zjistil primární rysy tohoto syndromu [21]:

- vyšší počet nově vzniklých adenokarcinomů, především kolorektálních,
- vyšší riziko rozsáhlejších nádorů,
- autozomálně dominantní dědičnost,
- vznik rakoviny tlustého střeva a rekta v dřívějším věku.

V pozdějších dobách byl tento syndrom pojmenován jako „hereditární nepolypózní kolorektální karcinom“ (HNPCC), od tohoto názvu se však v současnosti upouští a používá se termín „Lynchův syndrom“.

V dnešní době se u pacientů, kterým je diagnostikován Lynchův syndrom, očekává pravděpodobnost vzniku kolorektálního karcinomu až 5%. Pravděpodobnost vzniku dalšího nádoru tlustého střeva je u tohoto syndromu 16% a dále se zvyšuje riziko vzniku nádorového onemocnění endometria, žaludku, vaječníků, tenkého střeva, kůže, ledvin a mozku. Typickým znakem Lynchova syndromu je možnost diagnostikovat až zhoubný nádor, před jeho vznikem nejsou zaznamenány žádné nezhooubné změny [21].

Jsou známy dva typy Lynchova syndromu, Lynchův syndrom I (Hereditary site specific colon cancer) a Lynchův syndrom II (The cancer family syndrome). Pro Lynchův syndrom I je typická vyšší incidence nádorového onemocnění tlustého střeva je charakteristický zvýšenou incidencí rakoviny tlustého střeva. U Lynchova syndromu II je typická vyšší pravděpodobnost výskytu extrakolonických adenokarcinomů žaludku, slinivky břišní a děložní sliznice. Tyto adenokarcinomy vznikají v docela raném věku [23].

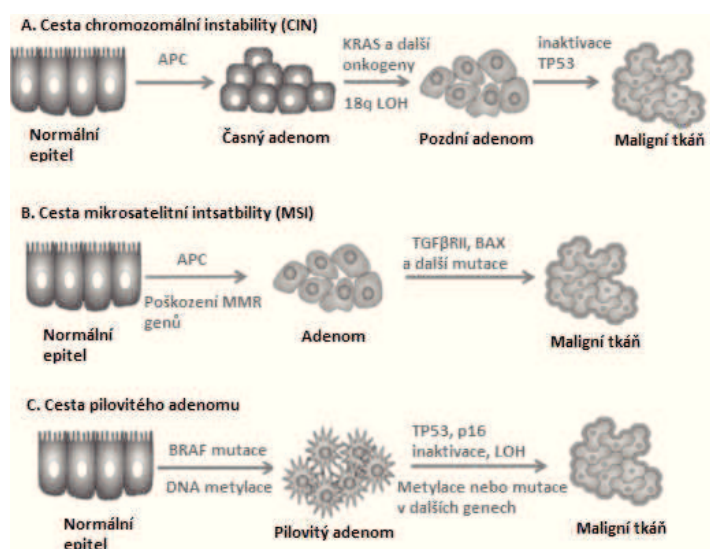
2.3 Biologické modely vzniku CRC

Rakovina tlustého střeva a rektu je způsobena kumulací získaných genetických a epigenetických změn. Díky těmto změnám dochází k přeměně žláзовých epitelových buněk do invazivních adenokarcinomů. Existují minimálně dva modely vzniku nádorů tlustého střeva a rektu sporadického charakteru.

Klasickým modelem je model adenom-karcinom, který vychází z Fearon Vogelsteinova modelu. Tento model je také označován jako tzv. supresorová cesta (adenoma-carcinoma pathway), protože dochází k mutacím onkogenů a tumor-supresorových genů (KRAS, APC, TP53, DCC). Tato cesta patří také do modelu chromozomální instability [24].

Druhým podstatným modelem vzniku CRC je model mikrosatelitní instability, dle něhož vzniká až 15 % případů kolorektálního karcinomu sporadické formy. Jeho charakteristickým rysem je akumulace mutací v mikrosatelitových sekencích MMR genů. Mezi nejvíce mutované geny z MMR genů patří MLH1 a MSH2.

Mezi těmito dvěma modely jsou určité molekulární rozdíly. Je známo, že nádory vznikající dle Fearon Vogelsteinova modelu jsou závažnější než nádory, které vznikají dle modelu mikrosatelitní instability [25]. Další možností vzniku CRC je tzv. serrated pathway, kdy dochází k hypermetylaci genů, která způsobuje zvýšenou MAPK/ERK signalizaci způsobující proliferaci buněk. Později dochází k metylaci nebo mutaci dalších genů a ztráta tumor-supresorových genů (TP53), což vede k vývoji kolorektálního karcinomu (viz Obrázek 6) [24, 26, 27].

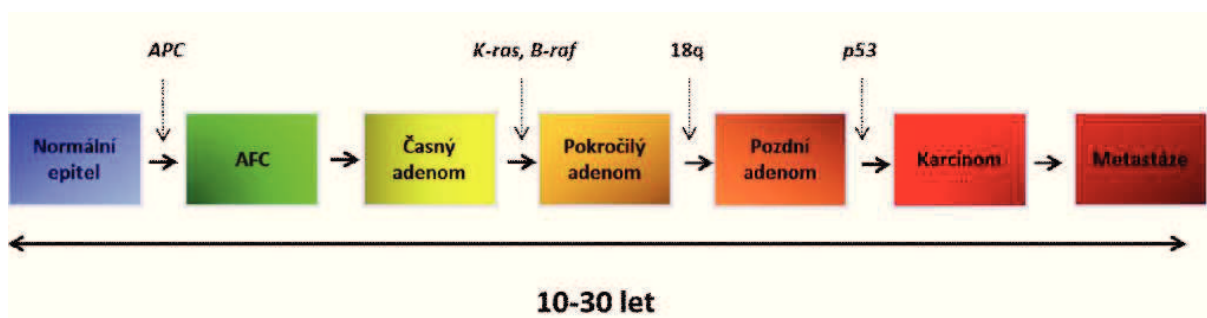


Obrázek 6 Modely vzniku CRC

2.3.1 Model adenom-karcinom

Nejčastěji vznikají zhoubné nádory (karcinomy) z již přítomných nezhoubných nádorů žláзовého epitelu (adenomů). Proto se tento model nazývá adenom-karcinom a byl navrhnut pány Fearonem a Vogelsteinem v roce 1990. Tento model popisuje jednotlivé kroky přeměny normálního epitelu na adenom, invazivní zhoubný nádor a dále na metastatický karcinom (viz Obrázek 7). U jednotlivých kroků jsou vidět specifické genetické změny. Díky tomu dochází k propojení tkáňové morfologie s genetikou [24].

V počátečním stádiu vývoje kolorektálního karcinomu dochází k inaktivaci tumor-supresoru APC, což způsobuje vznik abnormální tkáně ve střevním epitelu a následnou možnost vzniku brzkých adenomů. V dalším stádiu vývoje dochází k aktivaci proto-onkogenu KRAS či BRAF. Přeměna pokročilého adenomu v pozdní adenom je způsobena ztrátou chromozomu 18 a DCC genu. Další změnou je ztráta tumor-supresoru TP53 a získání dlouhého raménka (q raménko) chromozomu 8, které způsobují přechod pozdního adenomu v karcinom. Aby nádor začal metastazovat, je potřeba ztráty krátkého raménka (p raménko) chromozomu 8 [24, 28, 29].



Obrázek 7 Model adenom-karcinom

Díky modelu adenom-karcinom došlo k lepšímu pochopení molekulární patogeneze. Model prošel mnohými úpravami. Prvotní model byl lineární a domněnkou bylo, že pouze benigní a tubulovilózní adenomy se mohou měnit v invazivní karcinom. Model byl později přepracován a řídí se třemi základními principy:

- k zahájení karcinogeneze je třeba více genetických změn,
- progresse kolorektálního karcinomu se účastní několik tichých posílů,
- adenomy vznikají z ACF v epitelu tlustého střeva [30].

2.3.2 Model chromozomální instability (CIN)

Chromozomální instabilita se považuje za nestabilitu na úrovni celých chromozomů. Patří sem především numerické chromozomální změny nebo mnohonásobné strukturální aberace, které jsou způsobené především poškozením procesu mitózy. U kolorektálního karcinomu je tento model nejčastější, 65-70 % nádorů sporadického charakteru, které jsou způsobeny ztrátou či ziskem celého chromozomu nebo části chromozomu. Tyto změny vedou k variabilitě karyotypů mezi buňkami. Chromozomální instabilita je nejspíš dominantního charakteru, protože stačí ztráta pouze jedné funkční alely, aby se projevila. Vlivem chromozomální nestability dochází také k častým aneuploidiím (změna počtu chromozomů), amplifikacím genů (zmnožení) a také ke ztrátě heterozygosity (LOH). Ztráta heterozygosity rozlišuje nádory, které vznikají cestou chromozomální nestability od nádorů, které vznikají cestou mikrosatelitní nestability [31, 32].

Mechanismus, který vede ke chromozomální nestabilitě, je například chyba v oddělování chromozomů v mitóze, která je způsobena mutací genů kódujících proteiny (MAD1L1, MAD2L1, BUB1, KIF11), které regulují mitotický kontrolní bod.

Vznik aneuploidií není úplně známý. Aneuploidie mohou vzniknout například chybným rozchodem chromozomů (špatné uspořádání dělicího vřeténka), translokací, amplifikací či nondisjunkcí. Způsobují destabilizaci genomu, vznik klonálních mutací a heterogenní fenotyp. Aneuploidie tedy podněcují karcinogenzi zvýšením ztráty heterozygosity tumor-supresorových genů či amplifikací onkogenů [33].

Dalším způsobem vzniku chromozomální instability je neobvyklý počet či špatná funkce centromery nebo nefunkčnost telomery. Telomery jsou oblasti na konci chromozomů, které mají funkci zabránit vzájemnému spojení, exonukleolytické degradaci a nesprávné mitotického a meiotického rozdělení sesterských chromatid. Telomery obsahují opakující se sekvenci TTAGGG a jejich délka v normální buňce je kolem 7-13 kb. V somatické buňce dochází ke zkracování o 50-200 bp s každým buněčným dělením, což způsobuje snížení replikačního potenciálu.

Chromozomální instabilita způsobuje ztrátu wild type alely (normální varianta, která se vyskytuje ve volné přírodě) tumor-supresorových genů APC, P53 a SMAD 4. Tyto tumor-supresorové geny za obvyklých okolností zabráňují vzniku maligního fenotypu [31, 34].

2.3.3 Model mikrosatelitové instability (MSI)

Model mikrosatelitové instability byl sestaven jako alternativní model k modelu chromozomální instability (CIN). Tímto způsobem vzniká 15-20% kolorektálních karcinomů sporadického charakteru. Stejně jak u modelu chromozomální instability, progresse kolorektálního karcinomu je způsobena inaktivací APC proteinu [35, 36, 37].

Model MSI se vyznačuje akumulací mutací v mikrosatelitech. Mikrosatelity představují krátké tandemově opakující se sekvence DNA, které jsou citlivé na replikaci DNA. DNA polymeráza na těchto místech lehce sjíždí a způsobuje vznik kratších repetitivních sekvencí (delece) nebo delších repetitivních sekvencí (inzerce). Délka mikrosatelitů co se týče jednoho jedince je stejná, avšak u více jedinců se může měnit. Jestliže je nalezena v nádorové tkáni mikrosatelitní sekvence odlišné délky, dochází k mikrosatelitní nestabilitě. Mutace v mikrosatelitových oblastech jsou vyvolávány počátečním poškozením MMR genů, což způsobuje poškození reparačního systému. Jak moc je

reparační systém poškozen zjistíme pomocí mikrosatelitní instability (MSI), která je rozdělena na tři stupně [36]:

- MSS – mikrosatelity jsou stabilní → reparační systém je stabilní
- MSI-L – nízká četnost nestabilních mikrosatelitů nebo četnost nestabilních mikrosatelitních sekvencí je nižší než 30-40 % → reparační systém je lehce nestabilní
- MSI-H – vysoká četnost nestabilních mikrosatelitních sekvencí nebo četnost nestabilních mikrosatelitů je vyšší než 30-40 % → reparační systém je těžce nestabilní

Reparační systém MMR zahrnuje alespoň těchto sedm tumor-supresorových genů: MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 a PMS2. MMR geny kódují MMR proteiny vytvářející skupinu, která se naváže na závadné místo DNA, určí správný řetazec, chybu vystřihne a opraví. Jestliže je reparační systém funkční, opraví i již zmiňované chyby DNA polymerázy. Mutace v mikrosatelitních oblastech nádorových buněk se objevují 100 až 1000 krát častěji než u normálních buněk. Jedná se o mutace, které posunují čtecí rámec (frameshift mutations) [38].

2.3.3.1 MSI-L

Mezinárodní kritéria klasifikace nádorů byla stanovena v roce 1998. V těchto kritériích bylo doporučeno pět markerů (oblastí), které obsahovaly dvě mononukleotidové repetitivní sekvence (BAT26 a A4725) a tři dinukleotidové (D5S346, D2S123, a D17S250).

Pro stupeň instability mikrosatelitů MSI-L byla určena nestabilita v jedné z pěti dohodnutých oblastí [38].

Úloha MSI-L je stále nejistá, nebyl totiž objeven ani jeden významný rozdíl mezi MSI-L a MSS. Z tohoto důvodu MSI-L změny nemohou patřit mezi ukazatele genomové instability, ale mohou být užitečnými ukazateli mitotického dělení a klonality. Změny MSI-L mohou být skrytou příčinou genetické instability ve všech nádorech. National cancer Institute se domníval, že pokud by se analyzovalo dostatečný počet markerů, nádory, které nejsou označeny MSI-H, by spadaly do skupiny MSI-L. Avšak byla nalezena změna, která tuto domněnku vyvrátila. Z toho důvodu se ujednalo, že se jedná s větší pravděpodobností o rozdíly kvantitativní, které zachycují evoluční historii, než o kvalitativní rozdíly genetických drah, které se podílejí na karcinogenezi [35, 39].

Skupina autorů pokládali MSI-L změny za mezistupeň mezi MSS a MSI-H. Molekulární charakteristiky MSI-L nádorů jsou bližší k molekulárním charakteristikám MSS nádorů než k molekulárním charakteristikám MSI-H nádorů. Například KRAS mutace se objevuje více u MSI-L než u MSI-H nádorů tlustého střeva a rekta. Zjistilo se, že mutace, které byly přítomny v MSI-H nebyly přítomny v MSI-L. MSI-L změny tedy spadají do jiné molekulární fenotypické kategorie než MSI-H [40].

Některé články se zabývají existencí charakteristických markerů pro MSI-L a dokazují, že se jedná o markery MYCL a D2S123, které bývají mutované více než v nádorech MSI-H. Najdou se i skupiny autorů článků, kteří označují MSI-L nádory za jedinečné a s ničím nesrovnatelné [42].

2.3.3.2 MSI-H

Pro stupeň nestability mikrosatelitů MSI-H byla určena nestabilita ve dvou nebo více z pěti dohodnutých oblastí. Pokud porovnáváme tkáň s MSI-H nádoru s normální tkání, je nestabilita stanovena jako libovolná změna délky mikrosatelitních sekvencí (delece či inserce). [36].

Pro MSI-H je charakteristický vysoký počet mutací, které jsou způsobeny nefunkčností MMR systému. MSI-H vzniká poškozením obou funkčních alel jednoho genu. U kolorektálního karcinomu sporadického charakteru jsou příčinou mikrosatelitní instability MSI-H zárodečné mutace či epigenetické změny v genu MLH1 a MSH2. Mutace v ostatních MMR genech jsou méně časté. Je tedy možné nahlížet na to tak, že ztráta funkčnosti genu MLH1 a MSH2 je možné spojit s úplnou nefunkčností reparačního systému (MMR systému) [42].

Pacienti s MSI-H nádory se projevují různě, hlavně z klinického a histopatologického hlediska. Z tohoto důvodu je nutné a velmi důležité určit u každého pacienta zvlášť cestu karcinogeneze. Z jednoho článku vyplývá, že mikrosatelitní instabilita MSI-H je méně častá u pacientů, kterým byl diagnostikován kolorektální karcinom mezi 55 až 70 rokem, v ostatních případech je pravděpodobnost MSI-H větší. V ostatních článcích nebylo toto tvrzení potvrzeno.

MSI-H karcinomy se nachází většinou na pravé straně tlustého střeva. Bylo zjištěno, že těmito MSI-H nádory více je postiženo žen než mužů. Pro MSI-H nádory je typická hlubší invaze, ale nižší stupeň vývoje nádoru [43, 44].

Někteří autoři tvrdí, že pacienti s MSI-H nádory mají lepší prognózu než pacienti s MSI-L nádory či MSS, jiní tvrdí zase něco jiného. Lepší prognóza MSI-H nádorů byla zřejmá hlavně ve stádiu II a III rakoviny tlustého střeva a rekta. Pacienti, kteří měli vzdálené metastázy (stádium IV) a MSI-H v genu TGF- β II, vycházeli u nich lepší výsledky než u pacientů, kteří byli v tomto genu wild type. MSI status je považován za předpověď pozitivního výsledku, který nezávisí na stádiu nádoru a léčbě pacientů. Pro MSI je charakteristická bohatá lymfocytární infiltrace a menší výskyt metastáz. Proto je MSI-H veden jako fenotyp s příznivou prognózou [43, 44, 45].

U CRC sporadického charakteru nádory MSI-H neobsahují rozsáhlé cytogenetické abnormality a většinou ani nedochází k aneuploidiím.

2.4 TNM klasifikace CRC

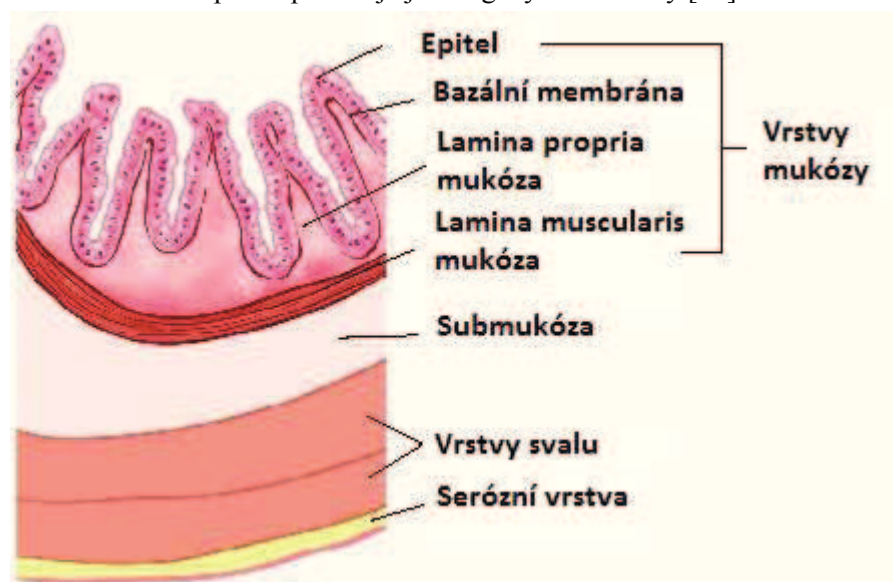
TNM klasifikace představuje klasifikaci zhoubných nádorů. TNM systém byl vyvinut mezi roky 1943 a 1952 Pierrem Denoix z Francie. Od té doby se postupně měnila, rozšiřovala a zdokonalovala.

Podrobný klinický popis zhoubných nádorů a histopatologická klasifikace má řadu účelů:

- pomáhá klinikovi při plánování léčby
- pomáhá při hodnocení léčebných výsledků
- usnadňuje komunikaci mezi různými léčebnými centry
- poskytuje určité údaje o prognóze
- podporuje dohled nad vývojem nádorových onemocnění [46]

Písmeno T klasifikuje rozsah primárního nádoru:

- | | |
|-----|---|
| TX | primární nádor nelze hodnotit |
| T0 | bez znamének primárního nádoru |
| Tis | intraepiteliální nádor nepřekračující bazální membránu nebo invaze do lamina propria mucosae - karcinom in situ |
| T1 | nádor postihuje submukózu, neprorůstá do svalové vrstvy |
| T2 | nádor postihuje tunica muscularis propria, prorůstá do svalové vrstvy, ale ne dále T3 nádor postihuje subserózu |
| T4 | nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury a/nebo prorůstá serózu |
| T4a | nádor prorůstá na serózu |
| T4b | nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury [46] |



Obrázek 8 Vrstvy střeva [47]

Písmeno N klasifikuje postižení regionálních uzlin:

- NX regionální mízní uzliny nelze hodnotit
- N0 regionální mízní uzliny bez metastáz
- N1 1 až 3 regionální mízní uzliny postiženy metastázemi
 - N1a metastázy v 1 regionální mízní uzlině
 - N1b metastázy ve 2 až 3 regionálních mízních uzlinách
 - N1c ložisko nádoru v subseróze nebo v měkké tkáni bez metastázy v uzlině
- N2 4 a více regionální mízní uzliny postiženy metastázemi
 - N2a metastázy ve 4 až 6 regionálních mízních uzlinách
 - N2b metastázy v 7 a více regionálních mízních uzlinách [46]

Písmeno M klasifikuje vzdálené metastázy:

- MX vzdálené metastázy nelze hodnotit
- M0 bez vzdálených metastáz
- M1 vzdálené metastázy
 - M1a metastázy v jednom orgánu
 - M2b metastázy ve více orgánech [46]

Tabulka 1 Rozdělení do stádií

Stádium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
II	T3, T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	jakékoliv T	N1, N2	M0
IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
IVA	jakékoliv T	jakékoliv N	M1a
IVB	jakékoliv T	jakékoliv N	M1b

2.5 Biologická léčba

Biologická léčba je také označovaná jako cílená léčba. Tato léčba působí na konkrétní vybranou molekulu, která se podílí na vývoji nádoru, což způsobuje dosažení značné účinnosti biologické léčby a menšího počtu nežádoucích účinků oproti klasické léčbě chemoterapií nebo radioterapií. Bylo prokázáno, že kombinace biologické léčby s chemoterapií prodlužuje přežití nemocných s pokročilým kolorektálním karcinomem. Vývoj biologika trvá až 15 let a stojí až 30 miliard korun, proto je biologická léčba většinou používána jako sekundární léčba, pokud nezabere chemoterapie či radioterapie. Biologika jsou většinou protilátky. Mezi nejznámější biologika pro CRC patří Cetuximab, Panitumumab a Bevacizumab [48].

2.5.1 Cetuximab

Cetuximab, jiným názvem ERBITUX, je chimérická IgG1 monoklonální protilátka, která tlumí fyziologické účinky epidermálního růstového faktoru (EGFR). Tato protilátka se váže na vnější doménu EGFR a tím brání navázání signální molekuly pro přenos signálu do buňky. Touto inhibicí dochází k útlumu množení a dělení buněk a snížení tvorby nových krevních kapilár. Cetuximab je indikován pouze pacientům, kterým byla vyloučena KRAS mutace [48].

2.5.2 Panitumumab

Panitumumab, neboli VECTIBIX, je rekombinantní, plně humánní IgG2 monoklonální protilátka, která se váže na EGFR. Tato vazba způsobuje přenos receptoru do buňky a tím útlum buněčného růstu a indukci apoptózy. Panitumumab je stejně jako Cetuximab indikován pouze pacientům, kterým byla vyloučena mutace KRAS a navíc i mutace NRAS [48].

2.5.3 Bevacizumab

Bevacizumab, jiným názvem AVASTIN, je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka, která se váže na vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a tím tlumí vazbu na receptory, což způsobuje útlum růstu nádoru a vaskularizaci nádoru. Bevacizumab je možné indikovat i pacientům, kteří mají mutaci RAS [48].

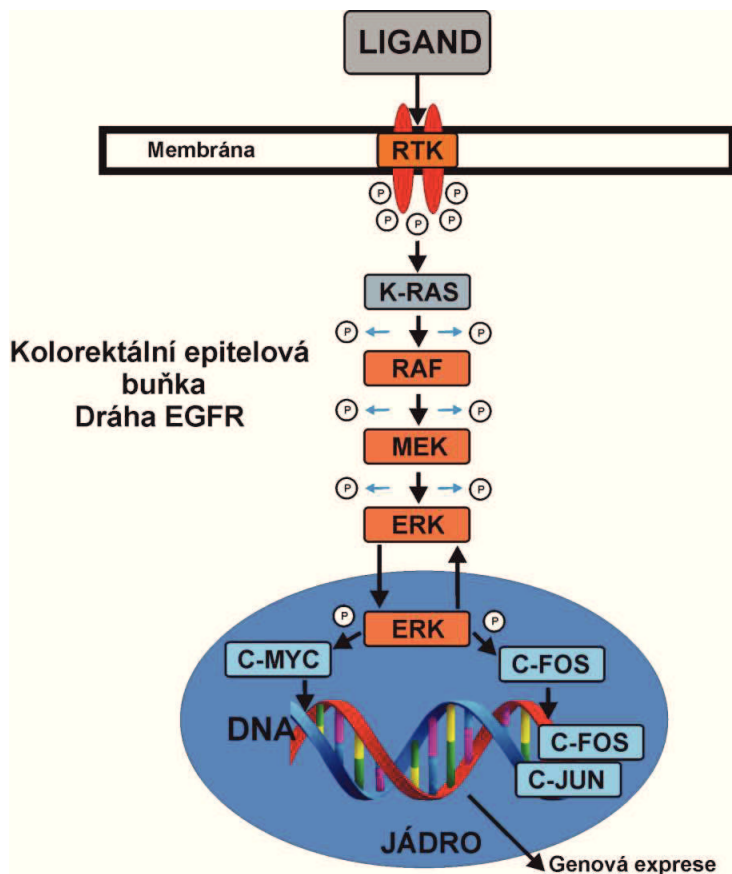
3 Praktická část

3.1 Model buňky

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit model buňky se signálovou dráhou EGFR v programu MATLAB. První model byl vytvořen v programu MATLAB Simulink. Druhý model byl vytvořen v programu MATLAB a skládá se ze Schoeberlova modelu, který je doplněn o pravděpodobnostní matici.

3.1.1 Signální dráha EGFR

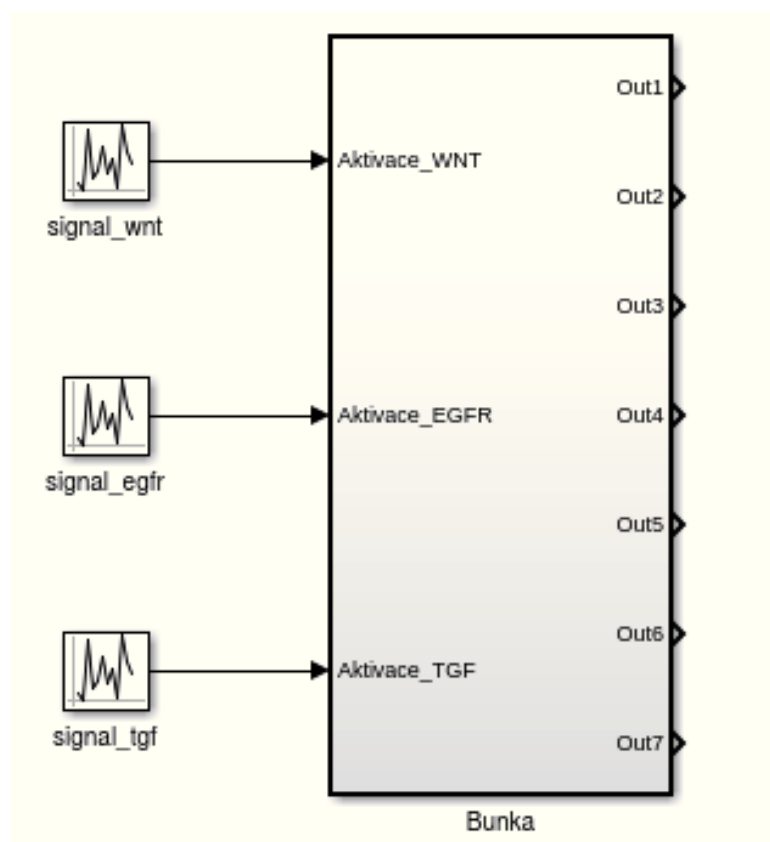
Na Obrázku 9 je zobrazena signální dráha EGFR. Ligand (signální molekula) se váže na receptor buněčného povrchu RTK, který způsobí dimerizaci receptoru a následné šíření signálu přes membránu do vnitřku buňky. Fosforylací molekul KRAS je započat přenos signálu od receptoru do jádra buňky. Kináza RAF je navázaná na protein KRAS. Tato vazba způsobí fosforylaci RAF a následující fosforylaci MEK. Kináza MEK se naváže na ERK, dojde k tvorbě dimeru a průchodu ERK do jádra, kde ovlivňuje řadu transkripčních faktorů, které kontrolují expresi genů pro proteiny řídící buněčný cyklus. C-MYC, C-FOS, C-JUN jsou transkripční faktory, které spouští a regulují transkripci DNA.



Obrázek 9 Signálová dráha EGFR

3.1.2 Model Simulink

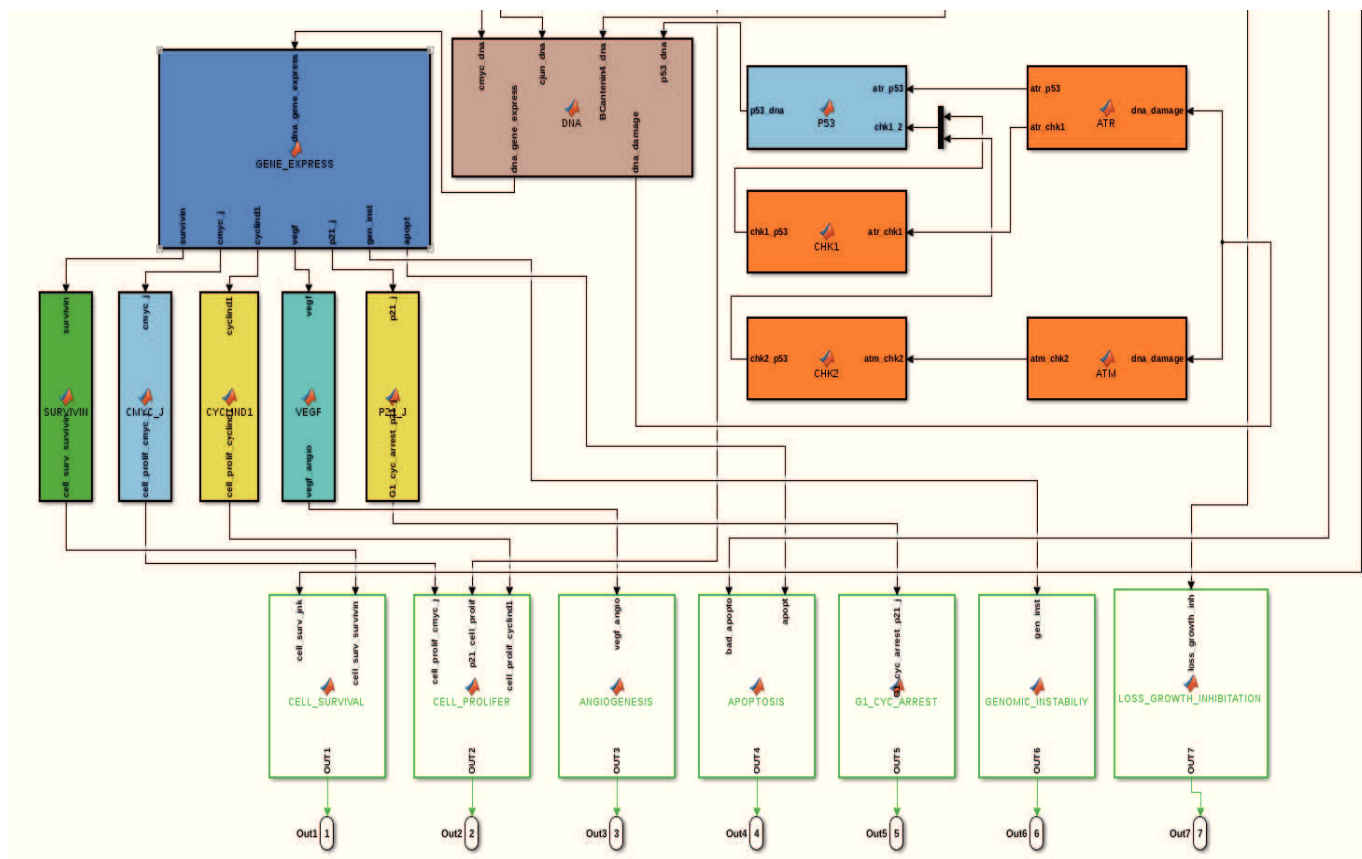
Tento model buňky (Obrázek 10) má tři vstupy a sedm výstupů. Za vstupy se považuje signál, který aktivuje jednu ze tří signálních drah – signální dráhu WNT, dráhu EGFR a dráhu TGF. Tato diplomová práce je zaměřena pouze na dráhu EGFR. Sedm výstupů označuje sedm stavů, do kterých se nádorová buňka může dostat – CELL_SURVIVAL (přežití poškozených buněk), CELL_PROLIFER (neomezený růst), ANGIOGENESIS (neregulovaná tvorba nových krevních kapilár → výživa nádoru), APOPTOSIS (porucha apoptózy), G1_CYC_ARREST (porucha G1 fáze buněčného cyklu → není kontrolována a opravena DNA), GENOMIC_UNSTABILITY (porucha reparačního systému – poškození MMR genů), LOSS_GROWTH_INHIBITATION (neomezené dělení buněk) viz Obrázek 11.



Obrázek 10 Model buňky Simulink

Na Obrázku 11 je možné vidět blokový diagram, který zobrazuje dráhu EGFR a další důležité kompartmenty. Oranžovou barvou jsou zobrazeny kinázy, tyrkysovou barvou buněčné proteiny, světle modrou barvou transkripční faktory, žlutou barvou jsou označeny kompartmenty buněčných cyklů, zelenou barvou kompartmenty, které souvisí s potlačením apoptózy. Hnědou barvou je označen blok DNA, který má čtyři vstupy a dva výstupy. Tyto čtyři vstupy zastupují kompartmenty, které jsou již v jádře a mohou působit na DNA (c_MYC, cJUN, BCANTENIN4 a p53).

Výstupy z bloku DNA jsou dna_gene_express a dna_damage. Výstup dna_damage je kontrolní bodem tohoto modelu. Pokud dojde k nějakému poškození DNA, sepne se opravný systém složený z několika kompartmentů (ATM, ATR, CHK1, CHK2 a p53), který poškození opraví a po opravě vstupuje do DNA bloku jako vstup p53. Tento systém je možno vidět na Obrázku 12. Na tomto obrázku je možné také vidět již zmiňovaných sedm stavů nádorové buňky.



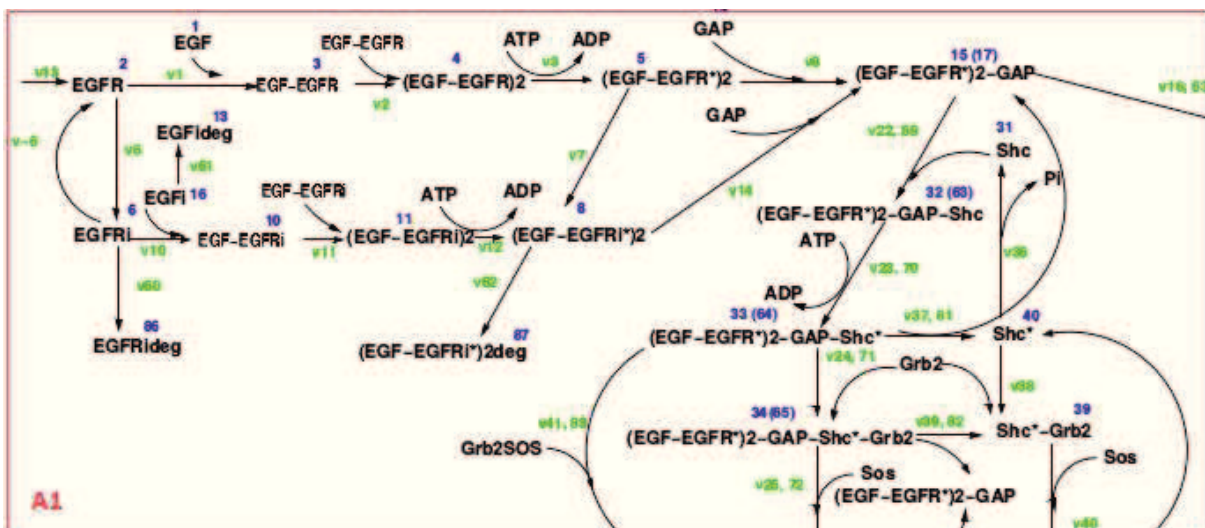
Obrázek 12 Blokový diagram modelu buňky

3.1.3 Schoeberlův model

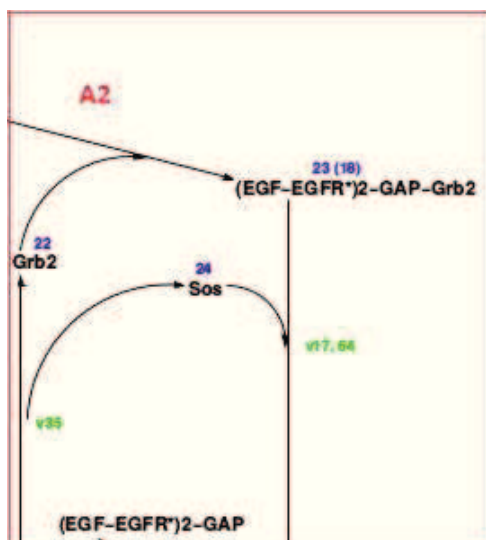
Schoeberlův model představuje výpočetní model, který nabízí integrovanou kvantitativní, dynamickou a topologickou reprezentaci intracelulárních signálních sítí založených na známých složkách signálních cest receptoru epidermálního růstového faktoru (EGF). Model poskytuje náhled na vztah signál-odezva mezi vázáním EGF na receptor na povrchu buňky a aktivaci proteinů v signalizační kaskádě [49].

Receptor EGF patří do rodiny receptorů tyrosinkinázy a je exprimován prakticky ve všech orgánech savců. EGF receptory hrají významnou roli během embryonálního a postnatálního vývoje a v progresi nádorů. Kromě jejich role v růstu a diferenciaci, se receptory EGF účastní transaktivačních procesů a podílejí se na vzájemné interakci s dalšími receptory. Vazba EGF na extracelulární doménu receptoru EGF indukuje dimerizaci receptoru a autofosforylaci intracelulárních domén. Množství signalizačních proteinů jsou pak připojeny k aktivovaným receptorům pomocí specifických fosfortyrosinových motivů. Toto modulární spojení signálních molekul s receptorem má za následek fosforylaci, přenos konformační změny, a/nebo proximální translokaci na cílové membránové molekuly. Jsou iniciovány dvě hlavní dráhy, závislé a nezávislé na Shc, což vede k aktivaci RAS-GTP. To zase stimuluje aktivaci kaskády MAP kinázy, kinázy RAF, MEK a ERK. Aktivovaná ERK fosforyluje a reguluje několik buněčných proteinů a nukleárních transkripčních faktorů. Inaktivace signalizace receptoru EGF je komplikovaná a není plně pochopena. Zdá se, že útlum signálu zahrnuje několik různých mechanismů, včetně internalizace, ubikvitinace a degradace. Některé důkazy naznačují, že komplexy receptorů EGF pokračují v signálu v endosomálních kompartmentech [49].

Tento matematický model popisuje dynamiku dráhy přenosu signálu EGF dle sítě zobrazené na Obrázku 13. Tento obrázek ukazuje schéma kaskády MAP kinázy indukované receptorem EGF. Kaskáda MAP kinázy může být iniciována cestami závislými na Shc a nezávislými na Shc. Každá komponenta je identifikována specifickým modrým číslem – jedná se o hodnoty získané z literatury, konstanty, nebo vypočítané komponenty c dle rovnic, viz příloha na CD. Modrá čísla v závorkách určují složky po internalizaci (přesun molekuly z vnějšího povrchu buňky do vnitra buňky). Šipky představují reakce uvedené v dodatkové tabulce (viz příloha na CD) a vyznačují reakční rychlosti v_1 až v_{125} (zelená čísla), jejichž výpočet je uveden v příloze na CD. Druhá zelená čísla identifikují rychlosti po internalizaci. Obrázek 13 je rozdělen na části A, B, C, D a E dle dráhy EGFR.



Obrázek 14 Část A1 - EGFR, cesta závislá na Shc [49]

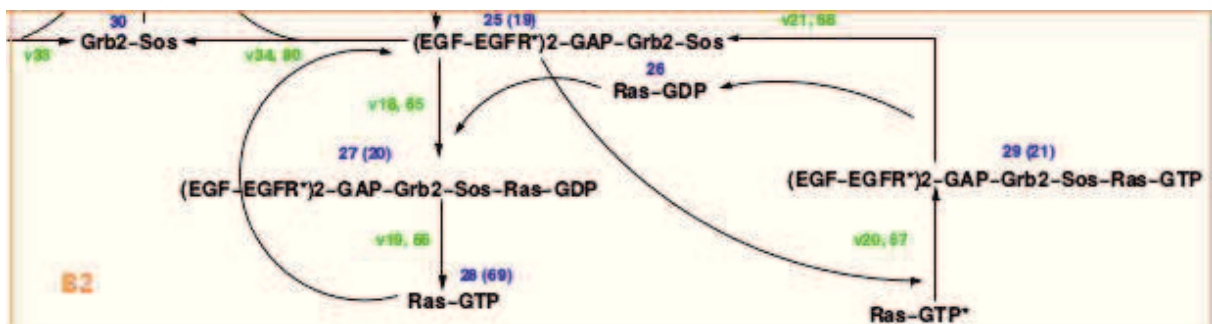


Obrázek 15 Část A2 - EGFR, cesta nezávislá na Shc [49]

Nakonec se Sos váže na tyto signální komplexy a umožňuje výměnu Ras-GDP na Ras-GTP viz Obrázek 16 a Obrázek 17.

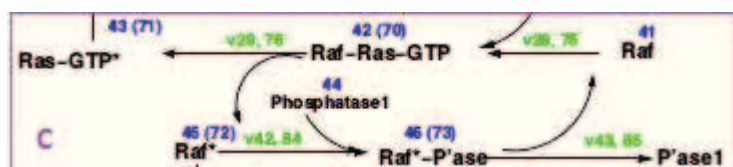


Obrázek 16 Část B1 - RAS, cesta závislá na Shc



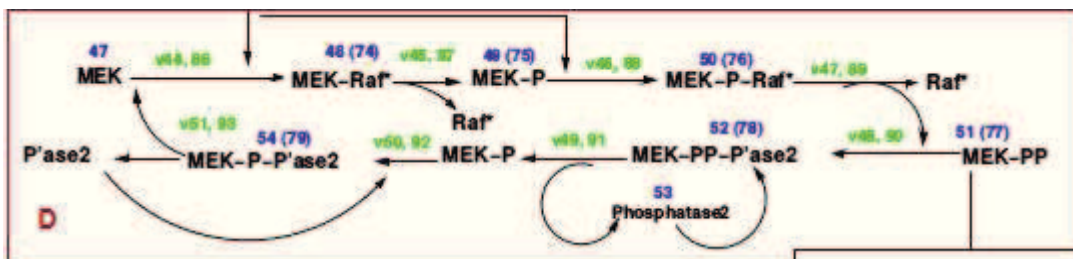
Obrázek 17 Část B2 - RAS, cesta nezávislá na Shc [49]

Ras-GTP tvoří komplex s Raf inicující aktivaci Raf* (Obrázek 18), což je komplikovaný vícestupňový proces, který je v tomto modelu zjednodušen pouze na jeden fosforylační krok. Předpokládá se, že jedna Ras-GTP molekula aktivuje pouze jednu Raf molekulu a po disociaci z Raf se recykluje na Ras-GDP aktivovaným GAP.



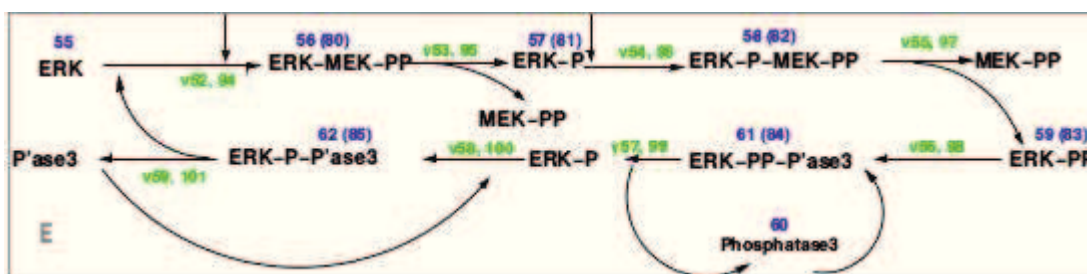
Obrázek 18 Část C – RAF [49]

Aktivovaný Raf* je prvním krokem kaskády MAP kinázy. Raf* fosforyluje MEK na prvním nebo druhém fosforylačním místě (Obrázek 19).



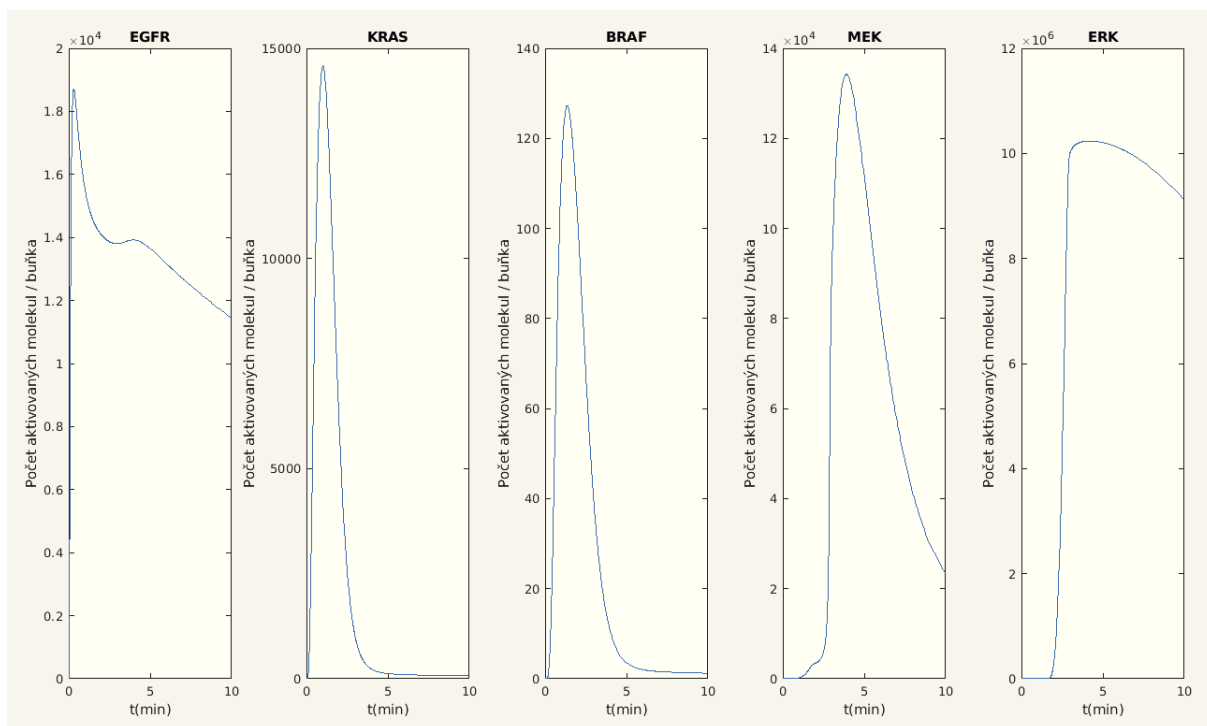
Obrázek 19 Část D – MEK [49]

MEK-PP katalyzuje dvojí fosforylaci ERK. Fosforylační komplexy Raf*, MEK, MEK-PP a ERK se nejprve disociují (oddělí) než dojde k vytvoření nového fosforylačního komplexu (Obrázek 20).



Obrázek 20 Část E – ERK [49]

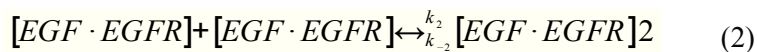
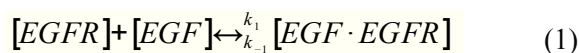
Model počítá změnu koncentrací 94 sloučenin, které jsou důležité pro stimulaci EGF receptoru. Obrázek 21 ukazuje kinetické chování nejdůležitějších přispěvovatelů signální kaskády (EGFR-KRAS-BRAF-MEK-ERK). Dochází k aktivaci (fosforylaci) 18700 EGF receptorů během 18 sekund a poté dochází k poklesu, který je v souladu s údaji z literatury. Během přenosu signálu zvenčí do vnitřku buňky se informace o koncentraci překládají do kinetické informace (fosforylace receptoru EGF). Koncentrace EGF a kinetika vazby ovlivňují rychlost aktivace receptoru EGF. Rychlost aktivace receptoru je definována jako počet fosforylovaných receptorů za sekundu. K aktivaci KRAS molekul (14580) dochází v 1 minutě, z grafu lze tedy vyčíst, že přenos signálu z EGFR do KRAS trvá pouhých 42 sekund. K aktivaci BRAF molekul (127) dochází v 1 minutě a 20 sekundách. Přenos signálu z KRAS k BRAF trvá pouhých 20 sekund, aktivuje se o hodně méně molekul. K aktivaci MEK molekul (134200) dochází v 3 minutě a 51 sekundách. Přenos signálu z BRAF do MEK trvá 2 minuty a 29 sekund. K aktivaci ERK molekul (10240000) dochází ve 4 minutě a 5 sekundách. Přenos signálu z MEK do ERK trvá pouhých 14 sekund. Můžeme pozorovat obrovské zesílení signálu u MEK a ERK [49].



Obrázek 21 Průběhy signálů v dráze EGFR

Součástí tohoto modelu jsou kinetické parametry a stavové proměnné, které udávají stav systému v určitém čase (např. počet molekul určité sloučeniny). Kinetické parametry byly převzaty z literatury (viz. příloha na CD). Model je založen na obyčejných diferenciálních rovnicích a skládá se z 94 stavových proměnných (sloučenin) a 95 parametrů. Může se zdát, že počet parametrů je poměrně malý vzhledem k počtu proměnných, je to proto, že stejná sada parametrů byla použita pro receptory na povrchu a uvnitř buňky. V tomto modelu se předpokládá, že identické reakce mají stejné parametry.

Odvození jedné z 94 obyčejných diferenciálních rovnic (pro vazbu EGF na receptor EGFR). Tvorba $[EGF \cdot EGFR]$ z $[EGF]$ a $[EGFR]$ (Obrázek 14) a dimerizace $[EGF \cdot EGFR]$ jsou považovány za reakce druhého řádu:



Výpočet pro rychlost reakce v_1 produkující $[EGF \cdot EGFR]$ a reakční rychlost v_2 , která spotřebovává $[EGF \cdot EGFR]$ jsou:

$$v_1 = k_1 [EGFR][EGF] - k_{-1} [EGF \cdot EGFR] \quad (3)$$

$$v_2 = k_2 [EGF \cdot EGFR][EGF \cdot EGFR] - k_{-2} [EGF \cdot EGFR]_2 \quad (4)$$

kde k_1 a k_2 jsou konstanty dopředné rychlosti a k_{-1} a k_{-2} jsou konstanty zpětné rychlosti.

Abychom zjistili změnu koncentrace určité složky $[C_i]$ v průběhu času, vypočítáme součet reakčních rychlostí produkujících $[C_i]$ minus rychlosti spotřebovávající $[C_i]$ podle následující diferenciální rovnice, kde i představuje jednu z 94 sloučenin:

$$\frac{d[C_i]}{dt} = \sum v_{\text{produkované}} - \sum v_{\text{spotřebováváné}} \quad (5)$$

Ostatní parametry rovnice byly sestaveny stejným způsobem, viz příloha na CD.

3.1.4 Pravděpodobnostní matice

Pravděpodobnostní matice je matice, ve které se počítají pravděpodobnosti spontánních a indukovaných mutací jednotlivých genů.

Spontánní mutace jsou mutace, které vznikají při chybě replikace DNA a jejich pravděpodobnost je 10^{-6} / buněčné dělení.

Indukované mutace jsou náhodné mutace vyvolané mutagenními faktory. Mutagenní faktory jsou buď fyzikální (např. UV, ionizující záření), chemické (např. barviva, organická rozpouštědla) a biologické (např. viry). Jelikož nejsou známy informace o zásahu mutagenními faktory, je v modelu pravděpodobnost indukované mutace $10^{-6} \cdot$ velikost kódující oblasti genu.

V tomto modelu se předpokládá shodný vliv na většinu námi sledovaných genů. Celková mutační rychlost u každého genu odráží jeho délku v párech bází kódující oblasti. Některé z těchto genů však mají z určitých důvodů celkovou pravděpodobnost mutačního zásahu zvýšenou a to v určitých oblastech dané sekvence genu tzv. hot spot místech. Tato místa jsou tedy výrazně častěji mutovaná oproti ostatním částem genu. Z těchto důvodů byla u genu KRAS a MGMT zvýšena priorita výskytu mutace.

Sledované geny a jejich velikosti jsou sepsány v Tabulce 2.

Tabulka 2 Sledované geny

Název genu	Velikost kódující oblasti genu [pb]
EGF	3624
EGFR	3633
KRAS	567
BRAF	2301
MAP2K1	1182
MAP2K2	1203
MAPK1	1083
MAPK3	1140
TP53	1182
MLH1	2271
MLH3	2805
MSH2	4083
MSH6	3414
MSH3	4362
PMS1	2799
PMS2	2589
APC	8532
MGMT	717
PIK3CA	3207

Postup pro výpočet buněčných cyklů střevní buňky:

Matice má rozměr 3000 řádků x 19 sloupců. 3000 řádků určuje počet buněčných cyklů a 19 sloupců určuje počet zkoumaných genů.

3000 buněčných cyklů proto, že model simuluje v rámci 30 let. Generační doba střevní buňky je 4-5 dní, to znamená, že každých 4-5 dní probíhá buněčný cyklus a vznikají nové střevní buňky.

1 rok = 365 a $\frac{1}{4}$ dní

30 let = 10957,5 dní

$10957,5 / 4$ (generační doba) = 2739,375 buněčných cyklů → po zaokrouhlení 3000 buněčných cyklů

Jak již bylo řečeno, indukované mutace vznikají náhodně, proto je v tomto modelu vytvořena matice s náhodně vygenerovanými hodnotami 0 a 1. Indukovaná mutace se v daném cyklu na genu projeví, pouze tehdy, pokud na pozici je hodnota 1.

Ukázka kódu pro indukované mutace:

```
PM=round(rand(3000,19)); % matice 3000 radku - pocet cyklu, 19 sloupce - pocet genu
                             % vygenerovani nahodne matice s hodnotami 0 a 1 -
                             nahodnost pro indukovane mutace
PM(1,:)=0; % prvni radek nuly
for i=1:3000; % 1 az 3000 cyklu
    PM(i+1,1)=i*1e-6; % pravdepodobnost spontanni mutace (po kazdem cyklu)
end
a_EGF=3624*1e-6; % pravdepodobnost indukovane mutace - dle velikosti genu
a_EGFR=3633*1e-6;
a_KRAS=3*567*1e-6; % nastavena vyssi priorita
```

Ukázka kódu pro výpočet pravděpodobnostní matice:

```
% zvyšování pravdepodobnosti - po kazdem cyklu se zvyšuje pravdepodobnost
% mutaci, bere se vždy hodnota z predchoziho cyklu + nova hodnota
```

```
PM(2,1)=PM(2,1)*a_EGF;
for i=3:3000;
    PM(i,1)=PM(i-1,1)+PM(i,1)*a_EGF;
end
PM(2,2)=PM(2,2)*a_EGFR;
for i=3:3000;
    PM(i,2)=PM(i-1,2)+PM(i,2)*a_EGFR;
end
```

Hodnoty pravděpodobnosti mají vliv na Schoeberlův model. K vstupním hodnotám se připočítávají hodnoty pravděpodobnosti. Tímto způsobem jsou ovlivněny výstupy ze Schoeberlova modelu.

3.2 Systém p53

Regulace buněčného cyklu v mnohobuněčném organismu podléhá přísné kontrole. Má zásadní význam pro embryonální vývoj i pro správnou funkci jednotlivých tkání dospělého organismu. V reakci na okolní i vnitřní stav je buňka schopna aktivovat signální dráhy zastavující buněčný cyklus. Tuto zástavu zajišťují inhibitory cyklin dependentních kináz (Cdkl). Regulaci aktivity inhibitorů Cdk má na starost protein p21, který představuje jeden z klíčových proteinů při supresi proliferace po poškození DNA. Jeho aktivita je spojena s proteinem p53, který je označován za hlavního strážce genomu. Při poškození DNA dochází ke stabilizaci p53 a nárůstu jeho aktivity jako transkripčního faktoru. Kromě jiného aktivuje i transkripci p21, který zajistí zástavu buněčného cyklu a poskytne tím čas na opravu poškozené DNA [1].

Systém p53 je v tomto modelu navržen tak, že kontroluje všechny vybrané geny a identifikuje jejich poškození. Původně měla být použita dle zadání neuronová síť backpropagation, avšak po podrobnějším prozkoumání teorie a nevydařeném naučení neuronové sítě, byl zvolen jednodušší a efektivnější způsob. Míra poškození je nastavena pomocí dvou prahů, práh opravitelnosti a práh neopravitelnosti. Hodnota prahu opravitelnosti je nastavena na 0.7, což znamená 70% pravděpodobnost mutací. Práh neopravitelnosti je nastaven na 0.9 (90% pravděpodobnost mutací).

Vstupem do systému p53 je pravděpodobnostní matice. Jak již bylo řečeno, dochází ke kontrole všech vybraných genů. Pokud je hodnota pravděpodobnosti vyšší než hodnota prvního prahu, ale nižší než hodnota druhého prahu, dochází k opravě a hodnota pravděpodobnosti se sníží pod hodnotu prvního prahu. Pokud však hodnota pravděpodobnosti vzniku mutace vzroste nad druhý práh, systém se zastaví a program vypíše hlášku typu: „mutovaný EGF – nelze opravit“ a napíše i v kolikátém buněčném cyklu došlo k takto výraznému poškození genu. Překročení prahu neopravitelnosti má vliv na DDR bariéru (DNA damage response).

Ukázka kódu pro systém p53:

```
% prah opravitelnosti - pokud bude překročen -> opravitelna mutace
po=0.7;

% prah neopravitelnosti - pokud bude překročen -> neopravitelna mutace -
% vliv na DDR bariéru
pn=0.9;

% System TP53, Identifikace poškozených genu
for i=1:3000
    if PM(i,2)>po & PM(i,2)<pn
        PM(i,2)=0.69;
    end
    if PM(i,2)>pn
        DI=sprintf('mutace EGFR - nelze opravit, cyklus:%d ',i)
        break
    end
end
```

Výpis Command Window:

```
'mutace EGFR - nelze opravit, cyklus:493 '
```

Díky tomuto systému okamžitě zjistíme, kdy a které geny v modelu byly poškozeny. Tato informace je velmi důležitá pro vybrání vhodných pacientů k použití biologické léčby.

3.3 Systém MSI

MSI problematika je popsána v kapitole 2.3.

Systém MSI má za úkol identifikovat poškození reparačního systému buňky na základě výskytu MSI, tedy v důsledku poškození klíčových reparačních genů (MMR genů).

Vstupem do toho systém je opět pravděpodobnostní matice. Poškození všech genů bylo kontrolováno pomocí systému p53. V tomto systému se navíc kontroluje, kolik genů z MMR skupiny je poškozeno. Pokud není poškozen ani jeden gen, program vypíše hlášku „MSS – systém stabilní“. Pokud dojde k poškození jednoho až dvou genů, program vypíše hlášku „MSI-L – systém lehce nestabilní“ a pokud dojde k poškození tří a více genů, program vypíše hlášku „MSI-H – systém těžce nestabilní“.

Toto nastavení je určeno dle teorie v kapitole 2.3.3, která uvádí pro MSI-L četnost mutací nižší než 30-40 %. V tomto modelu je sedm MMR genů, z toho vyplývá, že práh pro MSI-L je dva mutované geny.

Ukázka kódu pro MSI systém:

```
c=length(find(b==1));  
  
% vypsání hlásky  
if c==0 % není poškozen žádný MMR gen  
    DI=sprintf('MSS - systém stabilní')  
end  
if c==1 & c==2 % poškozeny 1 až 2 MMR geny  
    DI=sprintf('MSI-L - systém lehce nestabilní')  
else  
    DI=sprintf('MSI-H -systém těžce nestabilní') % poškozeno více než 2 MMR geny  
end
```

3.4 DDR bariéra

V boji proti hrozbám způsobeným poškozením DNA buňky se vyvinuly mechanismy - kolektivně nazývané DNA-damage response (DDR) - pro detekci poškození DNA, signalizaci jejich přítomnosti a podporu jejich opravy. Buňky defektní v těchto mechanismech obecně vykazují zvýšenou senzitivitu vůči činidlům poškozujícím DNA a mnoho takových defektů způsobuje onemocnění. Přestože se soustředí na opravu DNA a signalizace poškození DNA zvlášť, tyto systémy fungují společně [50].

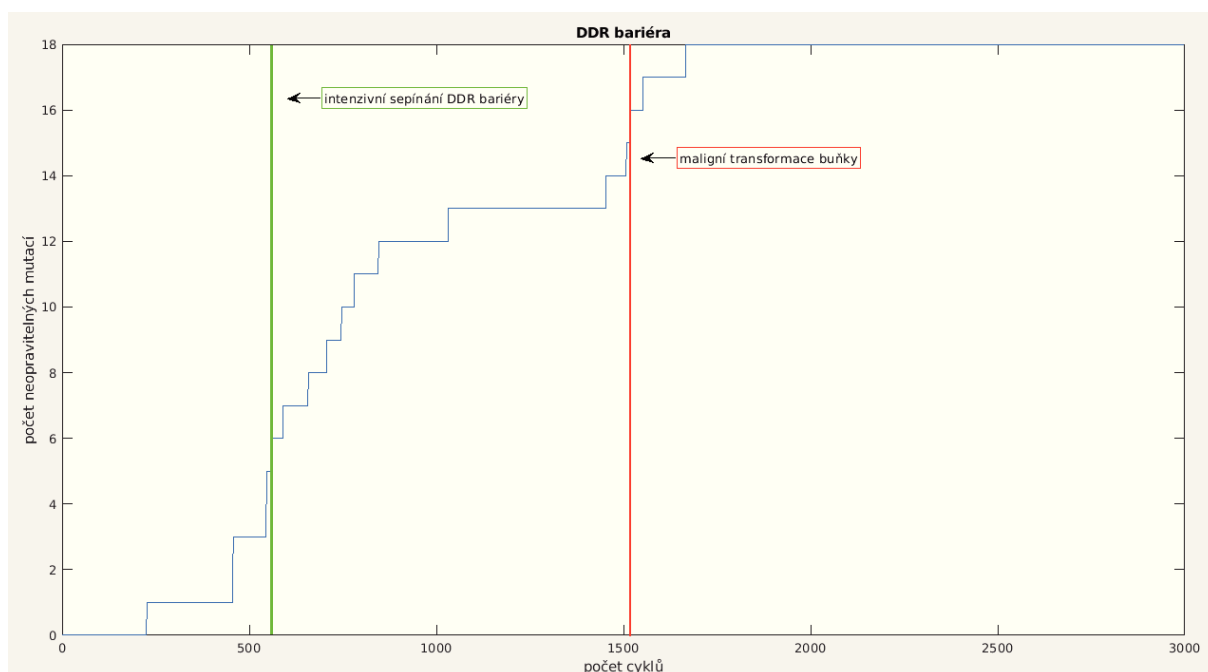
Strukturální změny na DNA vážně ovlivňují její funkce, jako je replikace a transkripce, a hrají hlavní roli v rozvoji nemoci a rakoviny. Komplikovaná a zapletená síť mechanismu odpovědi na poškození DNA (DDR) zahrnuje mnohočetné opravy DNA, procesy tolerance poškození a kontrolní body buněčného cyklu, které zajišťují integritu genomu [50].

Na zvýšené aktivitě DDR bariéry se mohou uplatňovat i jiné změny než nukleotidové mutace, např. chromozomové změny strukturální i početní. Tyto změny způsobují buněčný stres a aktivaci DDR bariéry. V důsledku poškození se stává DDR bariéra časem nefunkční a dochází k nekontrolované kumulaci změn, které může vyústit v maligní transformaci [50].

Původně měl být použit na DDR bariéru fuzzy expertní systém, avšak po podrobnějším prostudování teoretický poznatků, byl zvolen jednodušší a efektivnější způsob. Fuzzy systém byl použit pro rozřazení pacientů dle TNM.

DDR bariéra je v tomto modelu reprezentována jako křivka, která ukazuje míru poškození DNA. Jsou do ní zahrnuty všechna neopravitelná poškození sledovaných genů, aby bylo zřejmé, jak velký vliv to má na organismus.

Na počátku je tato bariéra nulová. Po každém cyklu, kdy proběhne zvýšení pravděpodobnosti mutace a jestliže dojde k překročení prahu neopravitelnosti, dojde ke zvýšení frekvence mutace a tím ke zvýšení hodnoty DDR bariéry (Obrázek 22).



Obrázek 22 DDR bariéra

Na Obrázku 22 je vyznačen zelený práh pro intenzivnější sepínání DDR bariéry. K tomuto jevu dochází po nevratném poškození šesti genů a vyznačuje se častějším neopravitelným poškozením sledovaných genů. Dále je vyznačen červený práh pro maligní transformaci buňky. Tento práh je nastaven dle modelu adenom-karcinom v kapitole 2.3.1, kdy v 75% cesty od adenomu ke karcinomu dochází k maligní transformaci. Z 19 sledovaných genů dojde k maligní transformaci, pokud bude poškozeno více jak 14 genů.

Ukázka kódu pro výpočet DDR bariéry:

```
% DDR bariera -> pokud doslo k prekročení prahu neopravitelnosti, DDR
% bariera se zvedne o 1

p_1=min(find(PM(:,1)>0.9));    % hledání překročení prahu neopravitelnosti

DDR=zeros(3000,1);
for i=1:3000;
    if PM(i,1)>pn
        DDR(i,:)=DDR(i,:)+1;    % zvednutí hodnoty DDR bariéry o 1
    end
end
```

3.5 Testování modelu

3.5.1 Poškození genů

Bylo provedeno několik simulací. V Tabulce 3 jsou uvedeny sledované geny a cykly, ve kterých došlo k neopravitelnému poškození genů. Jako první je poškozen gen APC, potom MMR geny, gen BRAF a KRAS a mezi posledními poškozenými geny je gen TP53. Tyto výsledky potvrzují model vzniku CRC dle Fearona a Vogelsteina viz kap 2.3.1. V Tabulce 3 jsou uvedeny dvě simulace, aby bylo vidět, že hodnoty cyklů se navzájem liší, čímž je možno zkontrolovat náhodnost indukovaných mutací. Pořadí se sice nezměnilo, protože pravděpodobnost indukované mutace je ovlivněna velikostí kódujících oblastí genů.

Model se testoval i na klinických datech. K testování modelu byl použit soubor pacientů s diagnózou kolorektálního karcinomu. Původní soubor byl převeden na soubor s numerickými hodnotami, které zastupují míru poškození jednotlivých genů (počet mutací). Díky tomuto převodu, nelze identifikovat pacienta. Je tedy splněna podmínka směrnice GDPR o ochraně osobních údajů.

Ukázka kódu pro testování systému p53 a MSI v modelu:

```
load pacienti.mat    % načtení souboru patientských dat

% p53 system
for i=1:length(pacienti)
    if pacienti(i,3)>0
        DI=sprintf('mutace KRAS, pacient:%d ',i)
        break
    end
end

% MSI system
for i=1:length(pacienti)
    if pacienti(i,8)==0
        DI=sprintf('MSS - system je stabilni, pacient:%d ',i)
    end
end
```

```

elseif pacienti(i,8)>0 & pacienti(i,8)<=2
    DI=sprintf('MSI-L - system je lehce nestabilni, pacient:%d ',i)
else
    DI=sprintf('MSI-H - system je nestabilni, pacient:%d ',i)
break
end
end
end

```

Příklad vypsaných dat v Command Window:

```

'mutace KRAS, pacient:1 '
'MSI-L - systém je lehce nestabilní, pacient:1 '
'MSS - systém je stabilní, pacient:6 '
'MSI-H - systém je nestabilní, pacient:10
'mutace TP53, pacient:43 '

```

Vypsaná data souhlasí s daty v souboru pacientů.

Tabulka 3 Výsledky poškození sledovaných genů

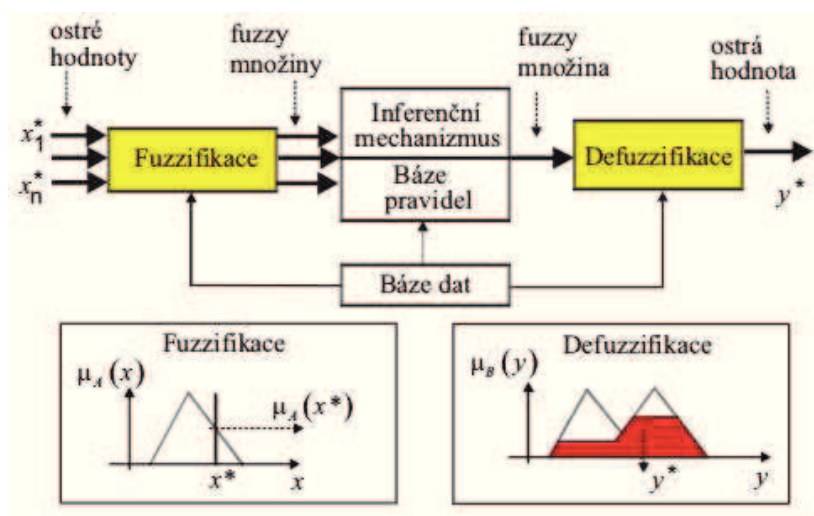
	1.simulace	2.simulace
GEN	CYKLUS	CYKLUS
APC	226	222
MLH3	456	406
MSH6	457	449
EGFR	493	518
PIK3CA	560	558
MSH3	546	567
MSH2	590	636
PMS1	658	658
PMS2	708	669
MLH1	781	763
BRAF	747	799
MGMT	846	807
KRAS	1032	1033
MEK-MAP2K2	1453	1437
MEK-MAP2K1	1508	1522
ERK-MAPK3	1553	1543
TP53	1518	1554
ERK-MAPK1	1666	1599
EGF	ne	ne

3.5.2 Rozřazení pacientů dle TNM

Pro testování modelu dle klasifikace TNM byl zvolen fuzzy systém typu mamdani. Jedná se o nejčastěji používanou techniku fuzzy inference. Tento systém byl vytvořen profesorem z londýnské univerzity Ebrahimem Mamdani v roce 1975 [50].

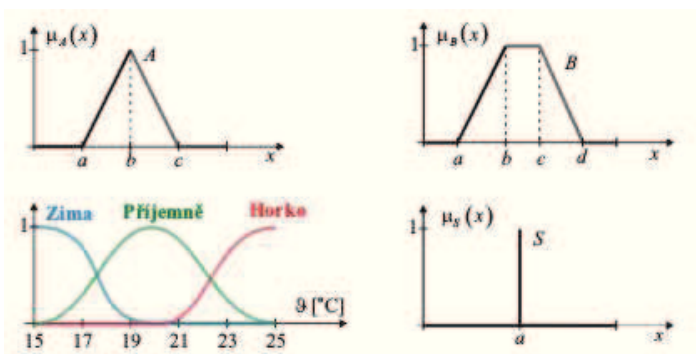
Proces fuzzy inference dle Mamdani se provádí ve čtyřech krocích:

- fuzzifikace vstupních dat
- nastavení pravidel
- agregace výstupů a pravidel
- defuzzifikace.



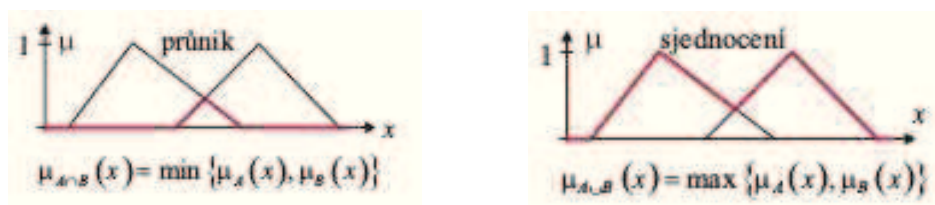
Obrázek 23 Fuzzy systém [52]

Proces inference je zobrazen na Obrázku 23. Prvním krokem je fuzzifikace, která představuje převedení ostrých hodnot (vstupních dat) na fuzzy množiny (jazykové proměnné s funkcí příslušnosti). Funkce příslušnosti může nabývat všech hodnot od 0 do 1. Tvar funkce příslušnosti může být různý, viz. Obrázek 24. Pro výpočetní jednoduchost se nejčastěji používají lineární funkce – konstantní, trojúhelníková, lichoběžníková (trapezoidální) a další [52].



Obrázek 24 Tvary funkcí příslušnosti [52]

V dalším kroku je potřeba nastavit jednotlivá pravidla, podle kterých fuzzy systém generuje výstupní fuzzy množiny. Fuzzy pravidla se tvoří pomocí implikace **IF antecedent THEN konsekvant** (jestliže vstup potom výstup) a pomocí logických spojek *and* (a současně) a *or* (nebo). Spojka *and* označuje průnik fuzzy množin, který definován operací *minimum*. Spojka *or* označuje sjednocení fuzzy množin definovaný pomocí operace *maximum* (Obrázek 25) [52].



Obrázek 25 Průnik a sjednocení [52]

Posledním krokem je defuzzifikace. V tomto bloku dochází k převedení fuzzy množiny na ostrou výstupní hodnotu. Metod defuzzifikace existuje mnoho, mezi nejčastěji používanou metodou je metoda těžiště. Výpočet výsledného ostrého výstupu leží v těžišti.

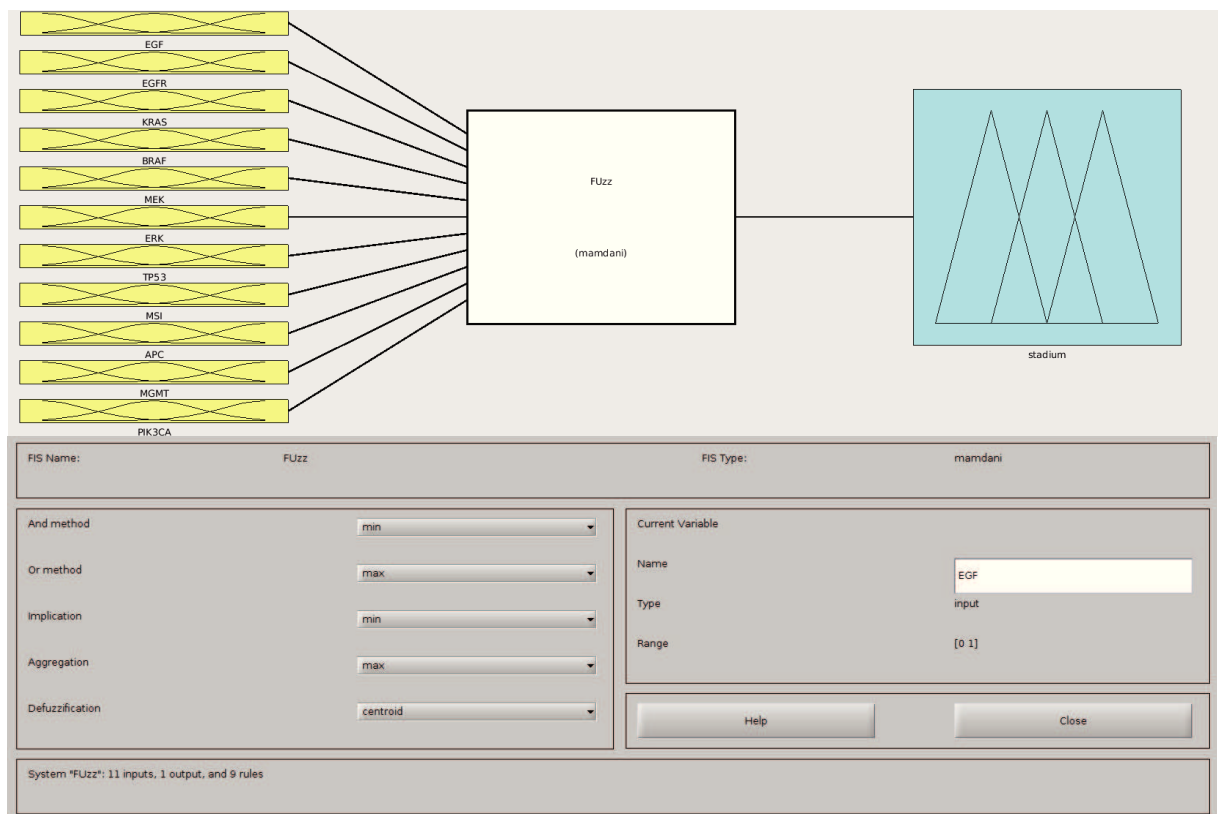
Inferenčním mechanismem se rozumí použitý typ fuzzy systému [52].

3.5.2.1 Fuzzy systém

K vytvoření fuzzy systému byl použit Fuzzy Logic Toolbox programu MATLAB, model mamdani. Model mamdani je testován na stejném souboru jako v kapitole 3.5.1. Do mamdani modelu vstupuje jedenáct vstupních hodnot (EGF, EGFR, KRAS, BRAF, MEK, ERK, TP53, APC, MGMT, PIK3CA a MSI). Bylo použito pouze těchto jedenáct ukazatelů, protože patří mezi nejdůležitější genetické ukazatele vývoje kolorektálního karcinomu a bylo k nim získáno nejvíce dat. Výstup tohoto modelu je pouze jeden a to rozřazení pacientů do stádií. Na Obrázku 26 je možno vidět vstupy a nastavené vlastnosti fuzzy systému.

Nastavené vlastnosti pro fuzzy systém:

Name='Fuzz'	% nazev FIS souboru
Type='mamdani'	% typ fuzzy systemu
Version=2.0	
NumInputs=11	% pocet vstupu
NumOutputs=1	% pocet vystupu
NumRules=9	% pocet pravidel
AndMethod='min'	% metoda pro spojku and
OrMethod='max'	% metoda pro spojku or
ImpMethod='min'	% metoda pro implikaci
AggMethod='max'	% metoda pro agregaci
DefuzzMethod='centroid'	% metoda pro defuzzikaci



Obrázek 26 Fuzzy systém

3.5.2.2 Vstupy a výstupy systému a jejich funkce příslušnosti

Každá vstupní hodnota má dva stavy – stav nepoškozen a stav poškozen. Tyto stavy jsou v modelu naznačeny pomocí trapezoidální (lichoběžníkové) funkce příslušnosti (ozn. trapmf), která je definována pomocí čtyř vrcholů v bodech $(x_1,0), (x_2,1), (x_3,1), (x_4,0)$. Každý vstup má vlastní funkci příslušnosti s vlastním nastavením vrcholových bodů. Na ose x leží vstupní proměnné a na ose y stupeň příslušnosti, který určuje, jak moc daná vstupní hodnota náleží do funkce příslušnosti. Jednotlivé vlastnosti všech vstupních funkcí příslušnosti jsou uvedeny níže. Byly nastaveny dle vstupních dat. Grafické zobrazení funkcí příslušnosti, např. pro vstup EGF, je na Obrázku 27.

Vlastnosti vstupních funkcí příslušnosti:

[Input1]

Name='EGF'

Range=[0 1]

NumMFs=2

MF1='neposkozen':trapmf,[-0.9 0 0.6 0.7]

MF2='poskozen':trapmf,[0.6 0.7 1 1.9]

[Input2]

Name='EGFR'

Range=[0 1]

NumMFs=2

MF1='neposkozen':trapmf,[-0.36 0 0.5 0.65]

MF2='poskozen':trapmf,[0.581 0.656 1.04 1.36]

[Input3]
 Name='KRAS'
 Range=[0 1]
 NumMFs=2
 MF1='neposkozen':trapmf,[-1.834 0 0.5 0.65]
 MF2='poskozen':trapmf,[0.618 0.718 1.12 1.13]

[Input4]
 Name='BRAF'
 Range=[0 1]
 NumMFs=2
 MF1='neposkozen':trapmf,[-0.5 0 0.5 0.65]
 MF2='poskozen':trapmf,[0.607 0.687 1.43931398416887 1.74]

[Input5]
 Name='MEK'
 Range=[0 1]
 NumMFs=2
 MF1='neposkozen':trapmf,[-0.157 -0.154 0.43 0.563]
 MF2='poskozen':trapmf,[0.5 0.52 1.11 1.22]

[Input6]
 Name='ERK'
 Range=[0 1]
 NumMFs=2
 MF1='neposkozen':trapmf,[-0.1354 -0.05932 0.46 0.5846]
 MF2='poskozen':trapmf,[0.466 0.5 1.13 1.19]

[Input7]
 Name='TP53'
 Range=[0 1]
 NumMFs=2
 MF1='neposkozen':trapmf,[-0.152 -0.152 0.45 0.568]
 MF2='poskozen':trapmf,[0.439 0.51 1.109 1.16]

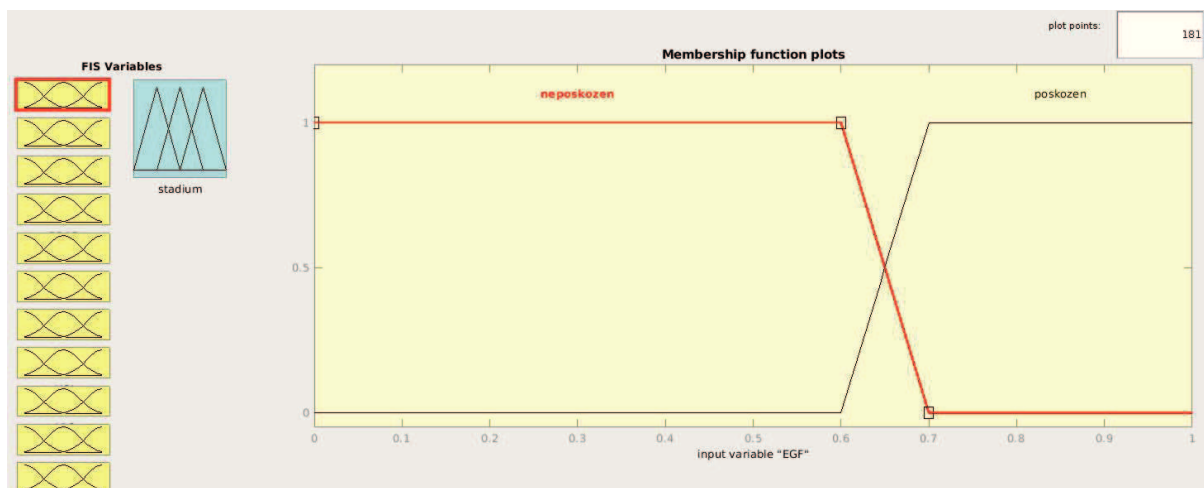
[Input8]
 Name='MSI'
 Range=[0 1]
 NumMFs=10
 MF1='neposkozen':trapmf,[-0.109861477572559 0.00263852242744056 0.602638522427441
 0.702638522427441]
 MF2='6':trapmf,[5.5 6 6.5 7]
 MF3='2':trapmf,[1.2 1.5 2 2.5]
 MF4='3':trapmf,[2.5 3 3.5 4]
 MF5='4':trapmf,[3.5 4 4.5 5]
 MF6='5':trapmf,[4.5 5 5.5 6]
 MF7='7':trapmf,[6.5 7 7.5 8]

```
MF8='8':trapmf,[7.5 8 8.5 9]
MF9='9':trapmf,[8.5 9 9.5 12]
MF10='poskozen':trapmf,[0.574 0.79 1.02506596306069 1.29]
```

```
[Input9]
Name='APC'
Range=[0 1]
NumMFs=2
MF1='neposkozen':trapmf,[-0.183 0.0172 0.408 0.537]
MF2='poskozen':trapmf,[0.476 0.62664907651715 1.15 1.2]
```

```
[Input10]
Name='MGMT'
Range=[0 1]
NumMFs=2
MF1='neposkozen':trapmf,[-0.173 -0.144 0.4 0.547]
MF2='poskozen':trapmf,[0.482 0.602 1.19 1.2]
```

```
[Input11]
Name='PIK3CA'
Range=[0 1]
NumMFs=2
MF1='neposkozen':trapmf,[-0.175 -0.157 0.4 0.545]
MF2='poskozen':trapmf,[0.474 0.6 1.144 1.19]
```



Obrázek 27 Funkce příslušnosti vstupů

Výstup reprezentuje jednotlivá stádia kolorektálního karcinomu (stádium 0 až stádium IV). V modelu je nastaveno pět trojúhelníkových funkcí příslušnosti (ozn. trimf), které jsou definovány třemi vrcholy v bodech $(x_1, 0)$, $(x_2, 1)$, $(x_3, 0)$. Vlastnosti výstupních funkcí příslušnosti jsou uvedeny dále. Vstupní data jsou dle nastavených pravidel rozřazena do jednotlivých stádií, viz Obrázek 28. Stádium 3 a stádium 4 mají největší společný průnik. Je to dáno tím, že stádium 3 a stádium 4 jsou si velmi podobné.

Ukázka kódu pro rozřazení patientských dat dle TNM:

% nastavení prahových hodnot pro jednotlivá stadia

```
if output(in,:)>0 & output(in,:)<0.2
```

```
    stadium(in,:)=0;
```

```
end
```

```
if output(in,:)>0.2 & output(in,:)<0.35
```

```
    stadium(in,:)=1;
```

```
end
```

```
if output(in,:)>0.35 & output(in,:)<0.54
```

```
    stadium(in,:)=2;
```

```
end
```

```
if output(in,:)>0.54 & output(in,:)<0.76
```

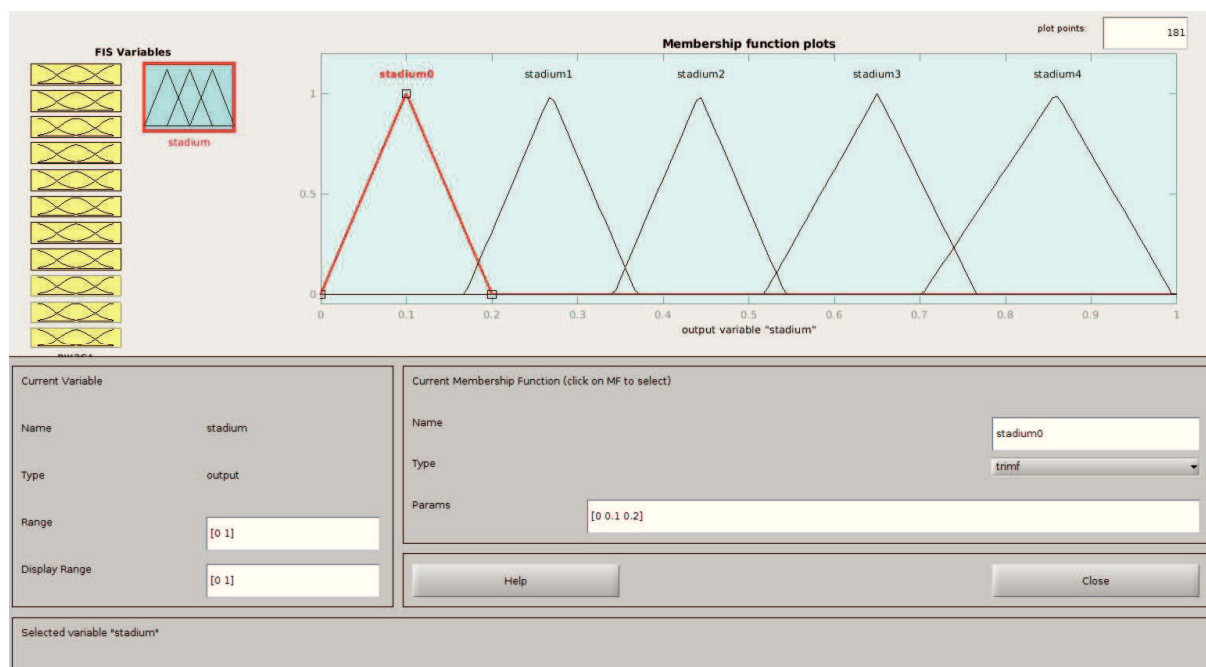
```
    stadium(in,:)=3;
```

```
end
```

```
if output(in,:)>0.76 & output(in,:)<1.1
```

```
    stadium(in,:)=4;
```

```
end
```



Obrázek 28 Funkce příslušnosti výstupů

Vlastnosti výstupních funkcí příslušnosti:

[Output1]

Name='stadium'

Range=[0 1]

NumMFs=5

MF1='stadium0':trimf,[0 0.1 0.2]

MF2='stadium1':trimf,[0.168733509234828 0.268733509234829 0.368733509234829]

MF3='stadium2':trimf,[0.342480211081794 0.442480211081794 0.542480211081794]

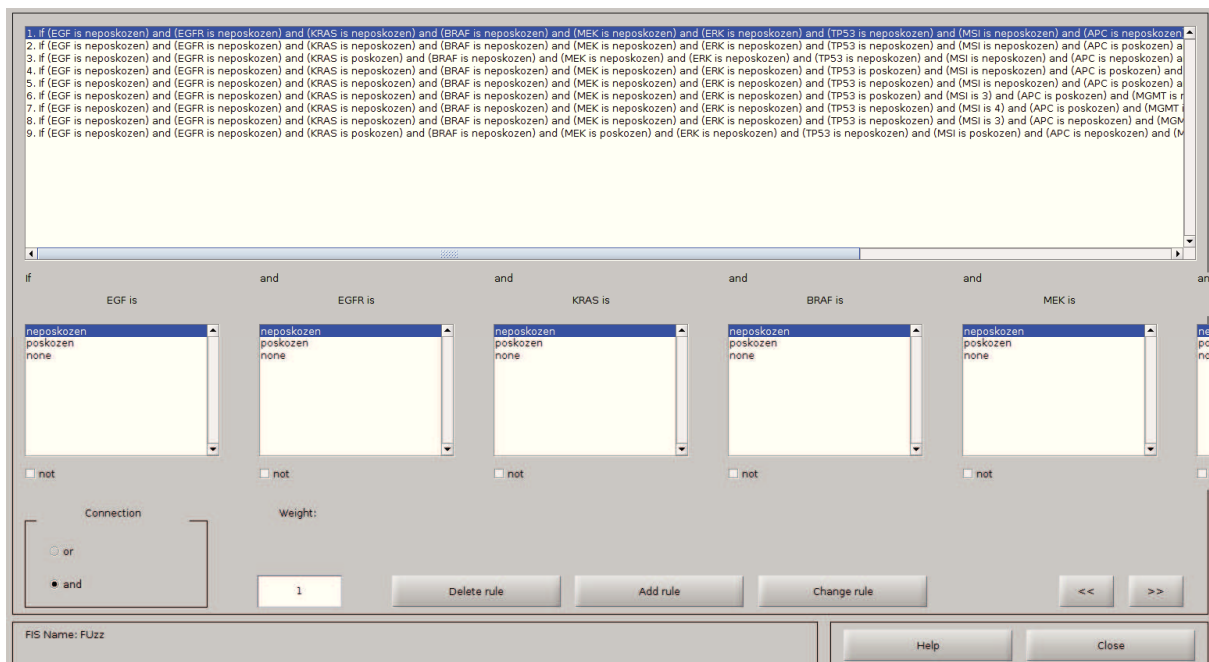
MF4='stadium3':trimf,[0.518 0.650395778364116 0.766]

MF5='stadium4':trimf,[0.703 0.858839050131926 0.995]

Všechny hodnoty byly nastaveny experimentálně.

3.5.2.3 Báze pravidel

V modelu je nastaveno devět pravidel. Pravidla jsou nastaveny experimentálně dle patientských dat. Pro stádium 1 jsou nastavena dvě pravidla, pro stádium 2 pouze jedno, pro stádium 3 také jen jedno a pro stádium 4 bylo nastaveno pět pravidel. Pro stádium 4 bylo nastaveno nejvíce pravidel, aby bylo lépe oddělitelné od stádia 3.



Obrázek 29 Nastavení pravidel

Nastavená pravidla:

1. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is neposkozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is neposkozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is neposkozen) and (MSI is neposkozen) and (APC is neposkozen) and (MGMT is neposkozen) and (PIK3CA is neposkozen) then (stadium is stadium1) (1)
2. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is neposkozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is neposkozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is neposkozen) and (MSI is neposkozen) and (APC is poskozen) and (MGMT is neposkozen) and (PIK3CA is neposkozen) then (stadium is stadium1) (1)
3. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is poskozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is neposkozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is neposkozen) and (MSI is neposkozen) and (APC is neposkozen) and (MGMT is poskozen) and (PIK3CA is neposkozen) then (stadium is stadium3) (1)
4. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is neposkozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is neposkozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is poskozen) and (MSI is neposkozen) and (APC is poskozen) and (MGMT is poskozen) and (PIK3CA is neposkozen) then (stadium is stadium4) (1)
5. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is neposkozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is neposkozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is neposkozen) and (MSI is neposkozen) and (APC is poskozen) and (MGMT is poskozen) and (PIK3CA is neposkozen) then (stadium is stadium4) (1)
6. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is neposkozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is neposkozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is poskozen) and (MSI is 3) and (APC is poskozen) and (MGMT is neposkozen) and (PIK3CA is neposkozen) then (stadium is stadium4) (1)
6. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is neposkozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is neposkozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is poskozen) and (MSI is 3) and (APC is poskozen) and (MGMT is neposkozen) and (PIK3CA is neposkozen) then (stadium is stadium4) (1)
8. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is neposkozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is neposkozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is neposkozen) and (MSI is 3) and (APC is neposkozen) and (MGMT is neposkozen) and (PIK3CA is poskozen) then (stadium is stadium4) (1)
9. If (EGF is neposkozen) and (EGFR is neposkozen) and (KRAS is poskozen) and (BRAF is neposkozen) and (MEK is poskozen) and (ERK is neposkozen) and (TP53 is neposkozen) and (MSI is poskozen) and (APC is neposkozen) and (MGMT is neposkozen) and (PIK3CA is neposkozen) then (stadium is stadium2) (1)

Na Obrázku 30 lze pozorovat implikaci, agregaci a defuzzifikaci. Vstupní hodnoty se zobrazují buď pomocí svislé červené linky (jezdce) nebo zapsaných hodnot v kolonce input. Vstupy se dají měnit. Pokud vstupní hodnota náleží do nějaké funkce příslušnosti (lichoběžník), vybarví se políčko žlutě a určí se stupeň příslušnosti vstupní hodnoty. Dle nastavených metod pro výpočet použitých implikací a spojek je provedena defuzzifikace. Každý řádek představuje jedno nastavené pravidlo. Jelikož v tomto modelu jsou ve všech pravidlech nastaveny spojky *and*, dochází k výpočtu minima. Z každého řádku se tedy vybere minimální hodnota, která je zobrazena jako modrá plocha ve výstupní funkci příslušnosti pro nadefinovaná stádia. Z těchto modrých ploch se vezme maximální hodnota a poté se vypočítá defuzzifikace dle vybrané metody, v tomto modelu je vybrána metoda těžistiště.



Obrázek 30 Implikace, agregace a defuzzifikace

3.5.2.4 Vyhodnocení rozřazení

Vstupní soubor byl předem rozřazen dle TNM klasifikace pro porovnání s rozřazením dle navrhnutého modelu.

Ukázka kódu pro vyhodnocení rozřazení pacientů:

```
stadia=zeros(220,1);
stadia(3:41,:)=1; % pacienti, kteří byli ve stadiu 1
stadia(42:96)=2; % pacienti, kteří byli ve stadiu 2
stadia(97:183)=3; % pacienti, kteří byli ve stadiu 3
stadia(183:220)=4; % pacienti, kteří byli ve stadiu 4
S=[stadium stadia]; % [(rozřazení pacienti modelem) (rozřazení pacienti dle TNM)]
spravne=stadium-stadia; % tam, kde vychází 0, doslo k správně rozřazeným pacientům
spra=length(find(spravne==0)); % počet správně rozřazených pacientů
xlswrite('vysledek',S); % výstup excel
```

V Tabulce 4 jsou zobrazeny počty pacientů, počty správně rozřazených a nerozřazených pacientů v jednotlivých stádiích a celkové počty.

Tabulka 4 Rozřazení pacientů

STÁDIUM	POČET PAC.	ROZŘAZENO	NEROZŘAZENO	ROZŘAZENO [%]
0	2	0	2	0
I	39	11	28	28
II	55	44	11	80
III	86	5	81	6
IV	38	1	37	3
CELKEM	220	61	159	28

Původní soubor měl 275 pacientů, avšak 55 z nich nebylo možné rozřadit dle TNM, proto byly tito pacienti vyřazeni. Do modelu tedy vstupovalo 220 pacientů – 2 pacienti byli ve stádiu 0, 39 pacientů bylo ve stádiu I, 55 pacientů bylo ve stádiu II, 86 pacientů bylo ve stádiu III a 38 pacientů bylo ve stádiu IV. Správně rozřazených pacientů bylo 61 a špatně rozřazených pacientů bylo 159. Model je tedy funkční jen z 28 %. Nejlépe bylo rozřazeno stadium II a I a nejhůře stádium III a IV. Funkčnost modelu by se dala zvýšit větším počtem dat a pravidel, vhodnějším nastavením parametrů a metod výpočtů a v první řadě homogenitou souboru.

Závěr

V předložené práci byl vytvořen model buňky se signální dráhou EGFR v programu MATLAB. První model byl vytvořen v programu MATLAB Simulink a sloužil ke grafickému zobrazení vybrané dráhy. Druhý vychází ze Schoeberlova modelu, který nabízí integrovanou kvantitativní, dynamickou a topologickou reprezentaci intracelulárních signálních sítí založených na definovaných složkách signální dráhy EGFR. Model byl dále doplněn pravděpodobnostní maticí, systémem p53, MSI, DDR bariérou a fuzzy systémem pro rozřazení dat pacientů dle TNM klasifikace.

Pravděpodobnostní matice obsahuje pravděpodobnosti spontánních a indukovaných mutací. V tomto modelu se předpokládá shodný vliv na většinu námi sledovaných genů. Celková mutační rychlost u každého genu odráží jeho délku v párech bází kódující oblasti. Vyšší priorita mutační rychlosti je nastavena u genu *KRAS* a *MGMT*, bylo totiž empiricky zjištěno, že tyto geny mutují daleko častěji než ostatní kvůli tzv. hot spot místech.

Systém p53 je navržen jako hlavní strážce, který kontruje poškození všech 19 sledovaných genů. Díky této funkci okamžitě zjistíme, kdy a které geny byly mutovány. Jako první byl poškozen gen APC, potom MMR geny, gen BRAF a KRAS a mezi posledními poškozenými geny byl gen TP53. Tyto výsledky potvrzují Fearon-Vogelstein model vzniku CRC. Této informace je možné využít i k vybrání vhodné biologické léčby pro pacienty s mutovanou, či wild type *KRAS* alelou.

DDR bariéra je v modelu navržena jako křivka ukazující míru poškození buňky v horizontu 30 let.

Po testování navrženého modelu, byla ověřena jeho funkčnost na souboru 220 pacientů s diagnózou kolorektálního karcinomu. Na základě testovaných dat bylo zjištěno, že správně rozřazených pacientů bylo 61 a špatně rozřazených pacientů bylo 159. Funkčnost modelu činila jenom 28%. Nejlépe bylo rozřazeno stádium II a I a nejhůře stádium III a IV. Nízká úspěšnost při testování vysvětlujeme nehomogenitou souboru. Je to dáno malým počtem informací o možných dalších a často i neznámých sekvenčních změn ve sledovaných genech. K nízké shodě přispívá i nedostatek klinických, patologických, histologických, ale i terapeutických informací.

Na základě získaných výsledků bylo by dobré získat maximum informací ve sledovaných genech, dalších laboratorních výsledků a v rámci spolupráce s klinickými specialisty více dat o zdravotním stavu pacientů i z dlouhodobějšího hlediska. Problémem je finanční stránka a časová náročnost takového projektu. V neposlední řadě by bylo vhodné zařadit do signální dráhy větší počet genů a rozšířit alternativní křížovatky mezi jednotlivými drahami.

Literatura

- 1 KOLÁŘ, Zdeněk a kolektiv. *Molekulární patologie nádorů*. Olomouc: EPAVA, 2003. ISBN 80-86297-15-2.
- 2 HOFMANOVÁ, Jiřina. *Genotoxicita a karcinogeneze* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2017-01-15]. ISBN 1802-128X. 2013. Dostupné z:
- 3 GOETZ, Petr a Věra KRUTÍLKOVÁ. Kancerogeneze. *Postgraduální medicína* [online]. 2002, (5) [cit. 2017-01-15]. Dostupné z:
- 4 Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspect and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull*. 2002;64:27-43.
- 5 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- 6 *Genetika-Biologie* [online]. MUDr. Antonín Šípek jr., 2014 [cit. 2017-01-15]. Dostupné z:
- 7 *Cell Biology. New Path* [online]. 2015 [cit. 2017-01-15]. Dostupné z:
- 8 LINDAHL, T a WOOD, RD. *Quality control by DNA repair*. *Science*. 1999; 286: 1897-1905.
- 9 DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer, principles and practice of oncology; Primer of the molecular biology of cancer*. 2011; Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer business.
- 10 HOEIJMAKERS, JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001; 41: 366-374.
- 11 Molecular Pathogenesis of Gynecologic Cancers. *Obgyn Key* [online]. Gynekology, 2016 [cit. 2017-01-15]. Dostupné z:
- 12 Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis*. *Nature*. 1993; 363: 558-561.
- 13 Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487: 330-337.
- 14 MORIMOTO, LM. Risk factor for hyperplastic adenomatous polyps: evidence for malignant potential? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002, (11) 1012-1018.
- 15 Watson AJ, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis*. 2011; 29: 222-28.
- 16 HENDRIKS, YMC, de JONG AE a kolektiv. Diagnostic Approach and Management of Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma): A Guide for Clinicians1, *CA Cancer J Clin*. 2006, (56) 213-225
- 17 FEARNHEAD, NS, JL WILDING a WF BODMER. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin*. 2002, (64), 27-43.
- 18 ŠTEKROVÁ, Jitka a kolektiv. Familiární adenomatózní polypóza a její genetické vyšetření. *Onkologická péče* 2007, (2), 13-15.
- 19 PLEVOVÁ, P., J. ŠTEKROVÁ, M. KOHOUTKOVÁ a kolektiv. Familiární adenomatózní polypóza. *Klin Onkol*. 2009, (22), 16-19.
- 20 Sieber, O. M., Lipton, L., Crabtree a kolektiv. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med*. 2003, (348), 791-799.
- 21 Daum, O., Beneš, Z., Hadravský, L., Stehlík, J., Černá, K., Dušek, M., Kokošková, B.,

- Michal, M. (2014): Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol* 50: 18-24.
- 22 HnCC-plevova
 - 23 Fitzgibbons, R. J., Lynch, H. T., Stanislav, G. V., Watson, P. A., Lanspa, S. J., Marcus, J. N., Smyrk, T., Kriegl, M. D., Lynch, J. F. (1987): Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Annals of surgery* 206: 289.
 - 24 Vogelstein B, Fearon ER. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61: 759-767.
 - 25 Morán, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernández-Marcelo, T., Frías, C., Sánchez-Pernaute, A., José Torres, A., Díaz-Rubio, E., Iniesta, P., Benito, M. (2010): Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 15; 2: 151–158.
 - 26 Goldstein, N. S. (2006): Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. *American Journal of Clinical Pathology* 125:146–153.
 - 27 Noffsinger, A. E. (2009): Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual Review of Pathology* 4: 343–364.
 - 28 Snustad, D. P., Simmons, M. J., Relichová, J., Doškař, J., Fajkus, J., Hořín, P., Knoll, A., Kuglík, P., Šmarda, J., Šmardová, J., Veselská, R., Boris Vyskot, B. (2009): *Genetika*. pp.668-684 Masarykova univerzita, Brno.
 - 29 Grady, W. M. (2004): Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Reviews* 23:11–27.
 - 30 Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato J., Kogawa K., Miyake H., Niitsu Y. (1998): Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *New England Journal of Medicine*, 339: 1277-1284.
 - 31 Walther, A., Houlston, R., Tomlinson, I. (2008): Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 57: 941–950.
 - 32 Pino, M. S., Chung, D. C. (2010): The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138: 2059-2072.
 - 33 Boveri, T (2008): Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. *Journal of Cell Science* 121: 1–84.
 - 34 Burrell, R. A., McClelland, S. E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M. Ch., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S. M., Gronroos, E., Chew, S. K., Rowan, Andrew J., Schenk, A., Sheffer M., Howell M., Kschischo M., Behrens A., Helleday T., Bartek J., Tomlinson, I. P., Swanton, Ch. (2013): Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494: 492–496
 - 35 Thibodeau, S. N., Bren, G., Schaid, D. (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816–819.
 - 36 Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sudransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodrigues-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., Srivastava, S. 44(1998): A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research* 58: 5248-57.
 - 37 Geiersbach, K. B., Samowitz, W. S. (2011): Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 135: 1269-77.

- 38 Kohonen-Corish, M. R., Daniel, J. J., Chan, C., Lin, B. P., Kwun, S. Y., Dent, O. F., Dhillon, V. S., Trent, R. J., Chapuis, P. H., Bokey, E. L. (2005): Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol* 23:2318-24.
- 39 Banerjea, A., Hands, R. E., Powar, M. P., Bustin, S. A., Dorudi, S. (2009): Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal Dis* 11:601–608.
- 40 Jass, J. R., Walsh, M. D., Barker, M., Simms, L. A., Young, J., Leggett, B. A. (2002): Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *European Journal of Cancer*. 38: 858–866.
- 41 Yearsley, M., Hampel, H., Lehman, A., Nakagawa, H., de la Chapelle, A., Frankel, W. L. (2006): Histologic features distinguish microsatellite-high from microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of the MLH1 promoter. *Hum Pathol* 37:831–838.
- 42 Hoeijmakers, J. H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366–734.
- 43 Ward, R., Meagher, A., Tomlinson, I., O'Connor, T., Norrie, M., Wu, R., Hawkins, N. (2001): Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 48:821–829.
- 44 Raut, C. P., Pawlik, T. M., Rodriguez-Bigas, M. A. (2004): Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutation Research* 568: 275–282
- 45 Benatti, P., Gafà, R., Barana, D., Marino, M., Scarselli, A., Pedroni, M., Maestri, I., Guerzoni, L., Roncucci, L., Menigatti, M., Roncari, B., Maffei, S., Rossi, G., Ponti, G., Santini, A., Losi, L., Di Gregorio, C., Oliani, C., Ponz de Leon, M., Lanza, G. (2005): Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 11:8332–8340.
- 46 SOBIN, L.H., M.K. GOSPODAROWICZ a C.H. WITTEKIND. *TNM CLASSIFICATION OF MALIGNANT TUMOURS*. Sedmé. UK: WILEY-BLACKWELL, 2009. ISBN 978–80–904259–6–5.
- 47 Colorectal. *Depositphotos* [online]. [cit.2018-06-28]. Dostupné z: <https://cz.depositphotos.com/10983648/>
- 48 FÍNEK Jindřich. Biologická léčba kolorektálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi*. 2008, (10), 3.
- 49 Schoeberl, Eichler-Jonsson, Gilles a Muller. Schoeberl model. *CellML* [online]. 2002 [cit. 2018-06-28]. Dostupné z: <https://models.cellml.org/e/53>
- 50 JACKSON, Stephan P. a Jiri BARTEK. The DNA-damage response in human biology and disease. *PMC* [online]. 2010 [cit. 2018-06-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2906700/>
- 51 přednášky z předmětu AUIN
- 52 JURA, Pavel. *Základy fuzzy logiky pro řízení a modelování*. Vyd.1. Brno:VUTIUUM, 2003